



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

LAYANNE NASCIMENTO FRAGA

**COMPOSTOS BIOATIVOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE
E CITOTOXICIDADE DA CASCA E POLPA DA PITOMBA
(*Talisia esculenta* (ST. HIL.) RALDK)**

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

LAYANNE NASCIMENTO FRAGA

**COMPOSTOS BIOATIVOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
CITOTOXICIDADE DA CASCA E POLPA DA PITOMBA (*Talisia
esculenta* (ST. HIL.) RALDK)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Izabela Maria Montezano de Carvalho.

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

F811c Fraga, Layanne Nascimento
Compostos bioativos, capacidade antioxidante e citotoxicidade da casca e polpa da pitomba (*Talisia esculenta* (ST. HIL.) RALDK) / Layanne Nascimento Fraga ; orientadora Izabela Maria Montezano de Carvalho. – São Cristovão, 2018.
131 f.

Dissertação (mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Pitomba. 2. Antioxidantes. 3. Compostos bioativos. 4. Talisia. I. Carvalho, Izabela Maria Montezano de, orient. II. Título.

CDU 613.2:582.746.46

Dedico este trabalho a Deus, por sempre guiar meus passos. Aos meus pais Lázaro (em memória) e Zailda, por sonharem os meus sonhos, por todo amor e dedicação, vocês são tudo para mim. Aos meus irmãos, Maria José, Katiane, Kaique e Lailson, meu sobrinho Bryan e vó Maria, por todo apoio e confiança que sempre depositaram em mim. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a Deus, por nunca desistir de mim, sempre guiando meus passos e me concedendo força durante essa trajetória. Muito obrigada por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida.

Aos meus pais, Lázaro (em memória), por ter sido um pai maravilhoso, por todo amor, dedicação, confiança que sempre depositou em mim, por todos os ensinamentos, tenho certeza que onde o senhor estiver, estará sempre cuidando de mim e feliz por minhas conquistas, como sinto sua falta. A Zailda, minha mãe, amiga e companheira de todas as horas, pelo exemplo de bondade, amor e humildade, por nunca medir esforços para ajudar todos ao seu redor. Vocês são tudo para mim, palavras não são suficientes para expressar o quanto os amo. Se hoje cheguei até aqui é porque sempre tive o apoio incondicional dos melhores pais do mundo. Essa vitória é nossa! Amo vocês.

Aos meus irmãos, Maria José, Katiane, Kaique e Lailson, Vó Maria e meu sobrinho Bryan por sempre me apoiarem e acreditarem que um dia chegaria até aqui. Amo vocês demais, muito obrigada por tudo!

A minha orientadora Prof^a Izabela (Iza), que é além de orientadora, uma grande amiga (não vou dizer uma mãe porque é muito jovem para tal comparação rs). Já são 4 anos de parceria e você sem dúvida é a melhor orientadora que alguém pode ter, estes anos de convívio me proporcionaram um enorme crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela confiança, carinho, amizade, amparo nos momentos em que mais precisei (e que não foram poucos) e por todos os ensinamentos, não só científicos, mas também aprendizados que levarei para a vida toda.

Aos meus amigos Gleice, Valquíria, Ellem, Maryze, Rafael, Alana, Vanessa, Karol, que acompanharam desde o início a minha trajetória quando eu ainda sonhava em participar da seleção e sempre acreditaram e torceram por mim. Obrigada por tudo, meus amores!

Em especial a minha amiga/irmã Adriane (Dri), que me acompanha desde o início da graduação e no Mestrado não foi diferente, sempre ao meu lado torcendo por mim e me apoiando (inclusive lendo meus arquivos rs), compartilhando de todos os momentos sejam eles bons ou ruins. Obrigada por tudo, amiga!

As amigas que ganhei com o mestrado, Anne e Bruna, juntas somos as super powers girls. Só tenho que agradecer a Deus por ter colocado vocês no meu caminho, para provar que pode existir parceria e amizade num meio tão individualista. Obrigada por me acolherem, por tornarem a rotina diária do laboratório bem mais leve. Nós passamos por muitos momentos de

tristeza, angústia, estresse, mas nos fizemos mais fortes diante de todas as dificuldades que enfrentamos por que temos uma a outra para contar, para fazer plantão de análise bioativa rs, plantão de análise estatística, ir para UFS meia noite com traje especial cuidar dos ratinhos. Obrigada por tudo. Esse trabalho é nosso!

Ao senhor César que nos recebeu muito bem no seu sítio e nos doou as pitombas que foram estudadas neste trabalho.

À Isaura que pagou os pecados comigo despolpando pitomba.

À todos do laboratório de bromatologia, em especial: Daniel, Raquel, Andrezza, Erivan, Allan Jonh, Nayara, Suzane, Igor, Lilian (TD) obrigada pela parceria, trocas de conhecimento e por tornar a rotina do laboratório bem mais leve e divertida.

As bioativas Nayara, Bruna, Thiale, Laís, Anne, nossa parceria desde o início das aulas foi crucial. Obrigada por tudo!

Aos amigos da Equipe Toppers Jymmys Lopes e Lúcio Marques.

À professora Elma por toda parceria, disponibilidade e confiança, desde o PIBIC nos salvando com as análises de antioxidantes.

À professora Ana Mara, professora Jane e professora Alessandra por toda atenção, dedicação, ensinamentos e confiança.

Ao professor André Quintão. Ao professor Leandro Bacci e todos do seu laboratório, em especial seus alunos Anne e Alisson que me receberam de braços abertos.

Ao professor Alberto e seu aluno Josué, por toda contribuição na análise química dos extratos.

À professora Luciana e ao professor Sócrates por toda disponibilidade sempre que precisei.

À professora Cristiane Bani e seu aluno Willian Propheta pela contribuição com os ensaios celulares.

À todas as professoras que fazem parte do PPGCNUT e ao secretário Iamm sempre disposto a nos ajudar e sanar nossas dúvidas.

À Universidade Federal de Sergipe.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Foram muitas as parcerias que foram feitas para realização deste trabalho e todas de igual importância, sem todos vocês esse trabalho não seria viável. A todos que, de alguma forma contribuíram para esse momento acontecer e que por ventura não os citei, minha gratidão!

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.”

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 <i>Talisia esculenta</i> (St. Hil.) Radlk	9
2.2 Compostos fenólicos.....	11
2.3 O papel de antioxidantes no estresse oxidativo	15
2.3.1 Métodos para determinação da atividade antioxidante.....	19
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Coleta do material vegetal	26
4.2 Reagentes utilizados	26
4.3 Métodos	27
4.3.1 Caracterização físico-química	27
4.3.2 Determinação de minerais.....	27
4.3.3 Vitamina C.....	27
4.3.4 Carotenoides totais.....	27
4.3.5 Obtenção de extratos	28
4.3.6 Determinação de Compostos fenólicos totais	28
4.3.7 Determinação de Flavonoides totais	28
4.3.8 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	29
4.9 Análise em espectrometria de massas - ESI-FT-MS Exactive Plus	31
4.10 Citotoxicidade.....	32
4.11 Análise estatística	33
REFERÊNCIAS	34
ARTIGO I <i>Talisia esculenta</i> (A. ST. HIL.) Radlk: Physico-Chemical Characteristics, Antioxidant Activity and Biological Activity	43
ARTIGO II Compostos bioativos e caracterização físico-química da polpa e da casca da <i>Talisia esculenta</i> (A. St.-Hill.) Radlk oriunda do estado de Sergipe/Brasil	70
ARTIGO III Perfil químico por espectrometria de massas-ESI-FT-MS, atividade antioxidante e citotoxicidade da casca e da polpa de <i>Talisia esculenta</i> (St. Hil.) Ralchk	89

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética	130
---	------------

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o terceiro maior produtor mundial de frutas, contempla uma das maiores biodiversidades do mundo, com aproximadamente 43.020 espécies vegetais identificadas. A ampla extensão territorial e variação climática do país favorece o surgimento de biomas únicos e ricos em espécies vegetais nativas, que são utilizadas pelas comunidades - seja para consumo e/ou como fonte de renda (GONDIM et al., 2013; BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b).

Nos últimos anos o interesse nas espécies frutíferas nativas aumentou consideravelmente, tanto por parte dos pesquisadores como dos consumidores que estão cada vez mais preocupados com estilo de vida e hábitos alimentares saudáveis. Vários estudos reportam que as frutas, além de nutrir, contém substâncias que podem propiciar benefícios adicionais à saúde, sendo tais benefícios atribuídos à presença de compostos bioativos, dos quais muitos com ação antioxidante, eficazes na proteção contra doenças crônicas não transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares e câncer (ALU'DATT et al., 2017; CELANT et al., 2015; GHAGANE et al., 2017; LESJAK et al., 2018; VIRGOLIN et al., 2017).

Entre os frutos nativos está a pitomba (*Talisia esculenta* (St. Hil.) Raldk), pertencente à família *Sapindaceae*, um dos principais produtos do extrativismo do Nordeste brasileiro e de comum ocorrência em áreas relativamente úmidas, podendo ser encontrada também nas matas secas das caatingas e do agreste (GIULIETTI et al., 2004; SANTOS; JÚNIOR; PRATA, 2012). Comercialmente, faz parte da culinária brasileira, em especial das regiões Norte e Nordeste, sendo sua polpa utilizada *in natura* e na fabricação de compotas, geléias e doces em massa com sabor semelhante ao damasco (*Prunus armeniaca* L., Rosaceae) (GUARIM NETO et al., 2000; VIEIRA; GUSMÃO, 2008).

Destaca-se que é um fruto pouco estudado, cuja composição e atividade biológica necessitam de maiores investigações. No que se refere a busca por suas propriedades como fonte alimentar, têm-se uma escassez de estudos que tratem da caracterização química e atividade biológica da polpa - que é a parte tradicionalmente comestível. Os trabalhos de Neri-numa et al. (2014) e Souza et al. (2016), avaliaram extratos da polpa da pitomba como provável fonte de compostos bioativos. Até o presente momento não se têm estudos que tratem da composição da casca. Percebe-se, então, a maior necessidade de estudos para aprofundar os conhecimentos quanto à caracterização nutricional e funcional deste fruto, principalmente da sua casca e polpa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

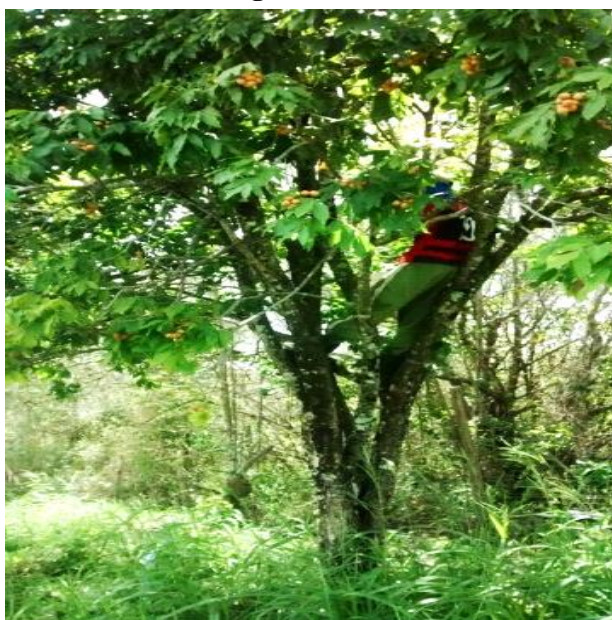
2.1 *Talisia esculenta* (St. Hil.) Radlk

A família *Sapindaceae* é predominantemente distribuída nas regiões tropical e subtropical do País. São árvores com folhas alternadas ou opostas, com flores usualmente unissexuais, frutos carnosos ou secos e sementes sem endosperma. Compreende 133 gêneros (49 monotípicos) e cerca de 1450 espécies (HARRINGTON et al, 2005). No Brasil, há a ocorrência de 28 gêneros e 418 espécies. Entre os representantes da família está a pitomba (*Talisia esculenta* (St. Hil.) Radlk) (SILVA, 2011).

A espécie *Talisia esculenta* (St. Hil.) Radlk, da família *Sapindaceae* popularmente conhecida como pitomba, é comum em áreas de matas úmidas e secas do Norte ao Nordeste do Brasil, também encontrada em outros países como a Bolívia e Paraguai (GIULIETTI et al., 2004). A pitombeira (Figura 1) floresce entre os meses de agosto e outubro, a safra ocorre entre os meses de janeiro a março (GUARIM NETO et al., 2003).

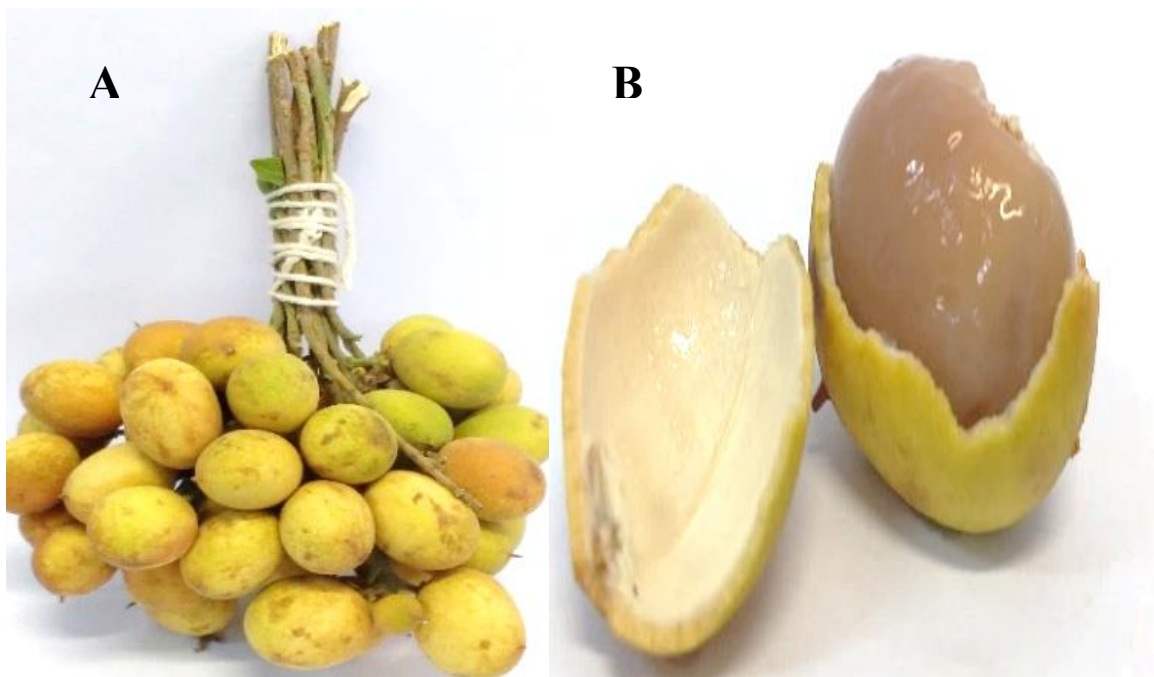
Fenotipicamente, a pitomba se constitui de casca grossa e dura revestindo a polpa (Figura 2), quando verdes têm até 1cm de comprimento, chegando a até 2,5cm de comprimento quando maduros, ficando quase ovalados e amarelados neste estágio (GUARIM NETO et al., 2003). Sua semente é envolvida por um arilo róseo-esbranquiçado (polpa), com testa avermelhada, sendo tal coloração característica observada logo após a sua separação da polpa, e quando secas apresentam-se escurecidas (VIEIRA; GUSMÃO, 2008).

Figura 1- Pitombeira.



Fonte: Próprio autor, 2017.

Figura 2- Pitomba (*Talisia esculenta*) no estágio de maturação, maduro. A- Cacho da pitomba, B- Polpa aparente.



Fonte: Próprio autor, 2017.

A pitomba tem grande aceitação pela população nordestina e encontra-se comercializada em feiras livres, em barracas nas ruas e em supermercados. Atualmente não se tem plantio organizado para fins comerciais, e as árvores que existem são de ocorrência natural. Pode ser consumida *in natura*, no qual se aprecia a polpa de sabor doce e simultaneamente ácido. Sua polpa é utilizada *in natura* e na fabricação de compotas, geléias e doces (BRASIL, 2002; ÉDER-SILVA, 2008; GUARIM NETO et al., 2000; SANTOS JUNIOR PRATA, 2012).

As sementes de pitomba têm sido estudadas como fonte de compostos com atividade inseticida, apresentando resultados promissores tanto para extratos vegetais, quanto para o óleo essencial (SANTOS et al, 2008; FREIRE et al, 2009; FREIRE et al, 2012).

Estudos que tratem da composição físico-química e funcional deste fruto são escassos. Os estudos de Silva et al (2008) e Marin et al (2009) avaliaram a composição físico-química da polpa da pitomba. As variáveis avaliadas por ambos os estudos foram: cálcio, ferro e zinco, os resultados para cálcio variaram de 10,6 a 26,7 mg/100g de polpa; ferro de 0,6 a 2,4 mg/100g de polpa e zinco de 0,5 a 0,84 mg/100g de polpa.

Em estudo de Neri-Numa et al (2014) e Souza et al (2016) os autores verificaram a atividade antioxidante e compostos bioativos dos extratos hidroalcoólico e metanólico de polpa de pitomba, respectivamente.

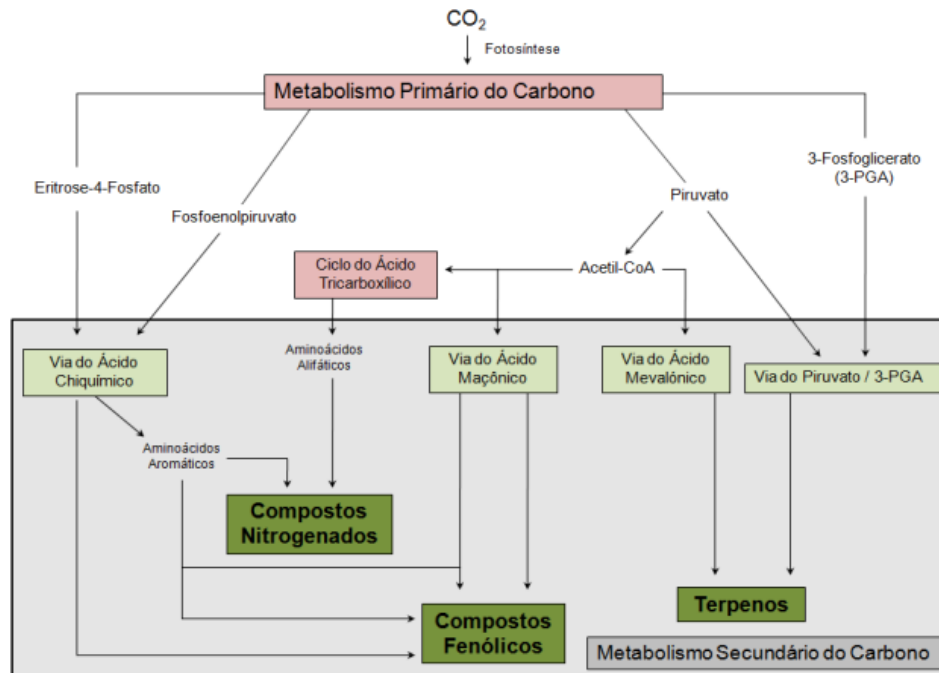
Estes utilizaram três métodos para determinação da atividade antioxidante, o sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), o de captura do radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e o Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). Foram identificados alguns flavonoides como a miricetina e quercetina, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Neri-Numa et al., 2014). Por meio da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS), foram identificados um total de 27 compostos orgânicos voláteis, dos quais os autores citam o acetato de fenetila (18%), o isopentilo (15%), e o 2-fenil-etanol (13%), como sendo os três principais responsáveis pelo aroma característico da pitomba (Souza et al., 2016). Ambos os estudos avaliaram os extratos da polpa da pitomba como fruto com provável potencial antioxidante.

2.2 Compostos fenólicos

Os CBAs são considerados potentes agentes antioxidantes, antitumorais e antiinflamatórios (CELANT et al., 2015; VIRGOLIN et al., 2017; TURECK et al., 2017; ALU'DATT et al., 2017). São substâncias que apresentam baixo peso molecular, encontradas em baixas concentrações nos alimentos, podendo ser de origem animal ou vegetal (BASTOS, 2009; ACHKAR, 2013; REIS et al., 2015; BARBA et al., 2017). Embora boa parte dos CBAs sejam substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas, dentre os CBAs também estão algumas vitaminas (A, C e E, os carotenoides) e minerais (selênio, zinco, cobre) (REIS et al., 2015; BARBA et al., 2017).

O metabolismo secundário vegetal é responsável pela produção dos chamados metabólitos secundários (Figura 4), compostos vegetais que protegem as plantas contra vários herbívoros e microrganismos patogênicos. Estes derivados do metabolismo secundário vegetal possuem estrutura complexa, baixo peso molecular e atividades biológicas (TAIZ; ZEIGER, 2009; PEREIRA; CARDOSO, 2012; BARBA et al., 2017).

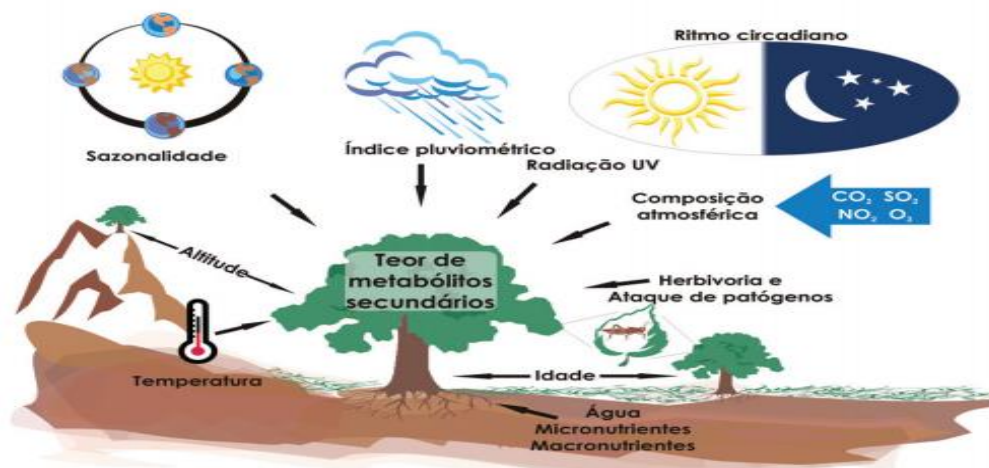
Figura 3- Principais caminhos da biossíntese dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.



Fonte: Taiz; Lincoln e Zeiger (2004).

A síntese de metabólitos secundários é influenciada pelas condições edafoclimáticas que incluem: sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, altitude, tipo de solo, poluição atmosférica, ou por ataque de patógenos (Figura 4). Todos estes fatores podem alterar a quantidade e qualidade dos compostos produzidos (GOBBO NETO; LOPES, 2007; WALTER; ROSA; STRECK, 2015).

Figura 4- Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.



Fonte: Gobbo-Neto e Lopes (2007).

Tais compostos são divididos em três grupos principais quimicamente distintos: os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Suas rotas de biossíntese são inter-relacionadas com o metabolismo primário (TAIZ; ZEIGER, 2009; SOETHE et al., 2016).

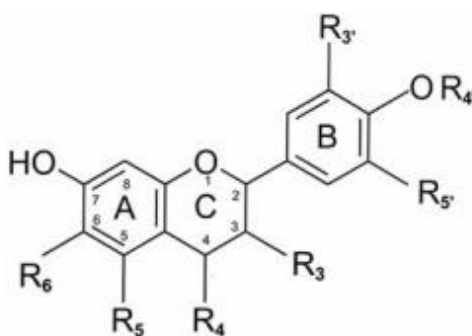
Os compostos fenólicos são derivados de duas rotas, a do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico. Na sua estrutura química, contém um grupo fenol (grupo hidroxila funcional em um anel aromático) (TAIZ; ZEIGER, 2009). Constituem um dos mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal. Mais de 8000 estruturas fenólicas estão atualmente conhecidas, e entre elas, mais de 4000 flavonoides foram identificados (TSAO, 2010; VERMA; SHUKLA, 2015).

Tais compostos são divididos em flavonoides (Figura 5) e ácidos fenólicos (Figura 6), encontrados amplamente em frutas e vegetais. A atividade antioxidante destes compostos se deve principalmente às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, sendo responsáveis pela transferência de hidrogênio que neutraliza a ação desses radicais (ACHKAR et al, 2013; SOETHE et al., 2016; GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2018).

Os flavanoides representam o maior grupo dos compostos fenólicos, que compreendem os flavonóis, flavanonas, isoflavanos, flavan-3-ols, flavonas e antocianinas. São derivados da fenilalanina e tirosina, com 15 carbonos distribuídos em três anéis (C6-C3-C6). Existem mais de 5000 flavonóides que foram identificados, responsáveis pelas cores amarelo, vermelho e azul das frutas. Dentre as funções biológicas, destacam-se suas propriedades como: potencial antioxidante, antiproliferativo, antimutagênico e antiinflamatório (TSAO, 2010; HAMINIUK et al., 2012; CORRÊA et al., 2015; GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2018)

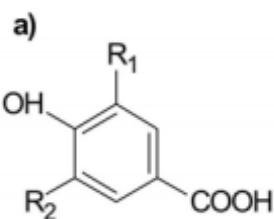
Por outro lado, os ácidos fenólicos dividem-se em dois grupos: os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos. Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em grandes quantidades em alimentos. Sua estrutura consiste de sete átomos de carbono, e destacam-se os ácidos p-cumáricos, ferúlico, caféico e sináptico. Os ácidos hidroxibenzóicos, por sua vez, apresentam um anel aromático, ligado a uma cadeia de três carbonos. Entre os compostos pertencentes a esta classe estão os ácidos: gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico (TSAO, 2010; HAMINIUK et al., 2012; CORRÊA et al., 2015; GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2018).

Figura 5- Estrutura base dos flavonoides mais comuns (presentes em alimentos), com anéis e posições numeradas.



Fonte: Beecher (2003).

Figura 6- Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

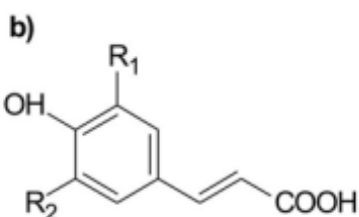


Ácido p-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = H$

Ácido protocatecuico: $R_1 = OH, R_2 = H$

Ácido vanílico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Ácido sirínico: $R_1 = R_2 = OCH_3$



Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = H$

Ácido caféico: $R_1 = OH, R_2 = H$

Ácido ferúlico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Fonte: Angelo e Jorge (2007).

Nos alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir para o amargor, a adstringência, a cor, o sabor, o odor e a estabilidade oxidativa. Nos últimos anos, a indústria alimentícia tem feito muito uso de tais compostos por serem capazes de inibir a peroxidação lipídica (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; ACHKAR et al., 2013).

Os compostos fenólicos no organismo impulsionam mecanismos de defesa antioxidante. Estudos apontam papel importante na redução da ocorrência de patologias como câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares, diabetes, artrite. Não obstante, a ação destes depende diretamente da sua biodisponibilidade (OLIVEIRA; BASTOS, 2011; SILBERBERG et al., 2006; GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2018).

Alguns dos fatores que podem interferir na biodisponibilidade destas substâncias são: a matriz do alimento, a fermentação intestinal, o pH, a excreção biliar, o tempo de esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal, bem como a forma química do composto de interesse, estrutura e quantidade de outros compostos ingeridos ao mesmo tempo (OLIVEIRA; BASTOS, 2011; SILBERBERG et al., 2006; GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2018).

2.3 O papel de antioxidantes no estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando não há equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)/espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e o sistema de defesa antioxidante (SIES, 1985; DASGUPTA; KLEIN, 2014; HALLIWELL, 2015; SIES, 2018). De acordo com Carrocho, Morales e Ferreira (2018) o processo que desencadeia o estresse oxidativo consiste em três etapas bem definidas: a iniciação, em que há a formação dos radicais; a propagação, pelos quais reagem com outras moléculas; e o término, quando se transformam em outros produtos.

Os radicais livres são moléculas reativas com um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada. As EROs são representadas por moléculas de radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e espécies não-radicalares, que são agentes oxidantes, e que podem ser convertidos em radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete. As ERNs incluem o óxido nítrico (NO^{\bullet}), um radical livre que pode reagir como $O_2^{\bullet-}$ gerando o peróxinitrito ($ONOO^-$), um radical altamente reativo e de elevado potencial danoso para biomoléculas (Tabela 1) (HALLIWELL, 2000; BURTON; JAUNIAUX, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; GASPAROVIC; ZARKOVIC; BOTTARI, 2018).

Estas espécies são produzidas em condições fisiológicas normais, atuam como sinalização de moléculas para ativar a proliferação celular, apoptose, diferenciação, respostas imunes. A produção destas se dá por meio de fontes endógenas e exógenas. A produção endógena ocorre principalmente nas mitocôndrias, na cadeia de transporte de elétrons e reações catalisadas por síntese de óxido nítrico (PISOSHI; POP, 2015; HORN et al., 2017; CHIKARA et al., 2017; KLAUNING; WANG, 2018).

As fontes exógenas, por sua vez, envolvem uma série de agentes químicos e físicos que atuam como pró-oxidantes inibindo as defesas antioxidantes celulares, ou, ainda, ativando enzimas produtoras de EROs (GOUVEIA; LIMA, 2017; GASPAROVIC et al., 2018). De acordo com Lee; Huang e Shyur (2013) o ambiente e os hábitos alimentares são os principais fatores exógenos, tais como: radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, fumo, álcool, pesticidas e poluentes químicos.

As EROs e ERNs podem causar danos ao DNA, mutação e apoptose celular, podem alterar a estrutura das proteínas via oxidação, reagir com lipídios (lipoperoxidação) levando à formação de produtos citotóxicos. Estas alterações estão associadas à uma infinidade de patologias, a exemplo da síndrome metabólica, doenças cardiovasculares (DCV), câncer, Parkinson, Alzheimer, enfisema, doenças inflamatórias e catarata (DASGUPTA; KLEIN, 2014; BIRBEN et al., 2012; PISOCHI; POP, 2015; CHIKARA et al., 2017; KLAUNING; WANG, 2018).

Tabela 1- Estrutura química, descrição, ocorrência e ação de espécies radicalares (ou seus intermediários) biologicamente importantes.

Espécies derivadas do oxigênio				
Espécies	Estrutura química	Descrição	Ocorrência	Ação
Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Radical mais potente na indução de dano celular	Aproximadamente em todas as células aeróbicas	Agente redutor
Radical hidroxila	HO^{\cdot}	Altamente reativo	Formado a partir da homólise da água	DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos
Radical hidroperoxil	HO_2^{\cdot}	Protonado a partir do O_2 -	Através do peróxido de hidrogênio	Membranas biológicas
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Não é um radical livre	Reações para produção de HO^{\cdot}	Proteínas e lipídios
Oxigênio singleto	1O_2	Molécula de oxigênio excitada; não é um radical livre	Produzidos pelos fagócitos, indução luminosa e reações catalisadas pelas peroxidases	Mutações no DNA
Espécies derivadas do nitrogênio				
Peroxinitrito	$ONOO^-$	Instável, tempo de vida curto, oxidante potente, propriedades semelhantes ao radical hidroxila	Intermediário formado pela reação $O_2^{\cdot -} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^-$	Moléculas biológicas, inclusive a grupos S-H das proteínas, provoca hidroxilação e nitração de compostos aromáticos
Dióxido de nitrogênio	NO_2^{\cdot}	Formado a partir da exposição de NO^{\cdot} ao ar ou da protonação de peroxinitrito $2NO^{\cdot} + O_2 \rightarrow 2NO_2^{\cdot}$	Fluidos biológicos	Potente iniciador da peroxidação lipídica em fluidos biológicos
Óxido nítrico	NO^{\cdot}	Instável	Formado a partir da oxidação de L-arginina pela ação das enzimas Óxido nítrico sintases (NOS)	Efeito tóxico quando produzidos em excesso, efeito citotóxico sobre células tumorais

Fonte: Adaptado de Garcez et al. (2004); Vasconcelos et al. (2007); Oliveira e Schoffen (2010).

O estresse oxidativo é controlado pelo sistema de defesa antioxidante que é responsável por manter o estado redox da célula, cuja função é inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das espécies reativas radicalares ou não-radicalares (HALLIWELL, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018).

Os antioxidantes são compostos que, presentes em pequenas concentrações quando comparados ao substrato oxidável, podem retardar ou inibir a oxidação de forma efetiva. Estas substâncias atuam como forma de defesa do organismo contra os efeitos danosos dos radicais livres (HALLIWELL, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; HALLIWELL, 2012; SIES, 2018).

Estes são classificados de acordo com o mecanismo de ação em antioxidantes primários e secundários. Os primários são compostos capazes de inibir ou retardar a oxidação, e têm a capacidade de doar elétrons, tornando os radicais estáveis. Os secundários dividem-se em sinergistas, removedores de oxigênio, agentes quelantes e mistos, e agem por diversos mecanismos, como: ligação de íons metálicos, inativação das EROs, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007; SILVA et al., 2010; GIADA, 2014; SIES, 2018).

Compostos antioxidantes são classificados ainda em enzimáticos e não enzimáticos. O primeiro inclui os compostos produzidos no organismo com função de bloquear a iniciação da oxidação, compõe-se pelas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), estas são as primeiras a agir evitando o acúmulo de ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio no organismo (Tabela 2.) (BURTON; JAUNIAUX, 2011; MENG, 2017; FRANCISQUETI, 2017; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018).

Tabela 2 - Sistemas enzimáticos antioxidantes ação biológica e seus sítios de ação.

Enzima		Ação biológica	Locais
Superóxido (SOD)	dismutase	Catalisa a desmutação do $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o em H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas	Abundante nas células aeróbicas
Catalase (Cat)		Catalisa a água e oxigênio para formação de H_2O_2	Eritrócitos e baço, rins dos mamíferos e fígado
Glutathiona (GSH-Px)	peroxidase	Catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para o seu álcool correspondente, sendo que a glutathiona opera em ciclos entre a sua forma oxidada e a sua forma reduzida	Citosol
Glutathiona redutase (GSH-Rd)		Mantêm o sistema de proteção celular íntegro através da redução da forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH)	Fígado e linfonodos

Fonte: Adaptado de Oliveira e Schoffen (2010).

O sistema não enzimático, por sua vez, compreende as substâncias produzidas pelo próprio organismo como a glutathiona, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), e os antioxidantes de origem exógena. Estes últimos são obtidos principalmente a partir da alimentação, sendo fontes naturais e/ou sintéticas, destacando-se os compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas, tais como as vitaminas C, E e A, alguns minerais, como o cobre, manganês, zinco, selênio e ferro (BURTON; JAUNIAUX, 2011; MENG, 2017; FRANCISQUETI, 2017; GOUVEIA; LIMA, 2017; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018).

Têm sido relatados efeitos benéficos dos antioxidantes exógenos contra as ROS, na redução do risco da aterosclerose (uma das principais complicações que dão origem as DCV), como uma estratégia para o tratamento de pacientes oncológicos, nas complicações associadas ao diabetes, entre outros (DASGUPTA; KLEIN, 2014; CHIKARA et al., 2017; SARANGARAJAN et al., 2017; KLAUNING; WANG, 2018).

2.3.1 Mensuração da atividade antioxidante: caracterização e particularidades dos métodos mais utilizados

Os antioxidantes e suas propriedades estão amplamente difundidos. Muitos métodos vêm sendo estudados para determinar a atividade antioxidante e a eficácia de compostos químicos ou extratos vegetais (ALVES et al., 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2015; VIRGOLIN et al., 2017). Os métodos apresentam princípios distintos para avaliar o potencial antioxidante

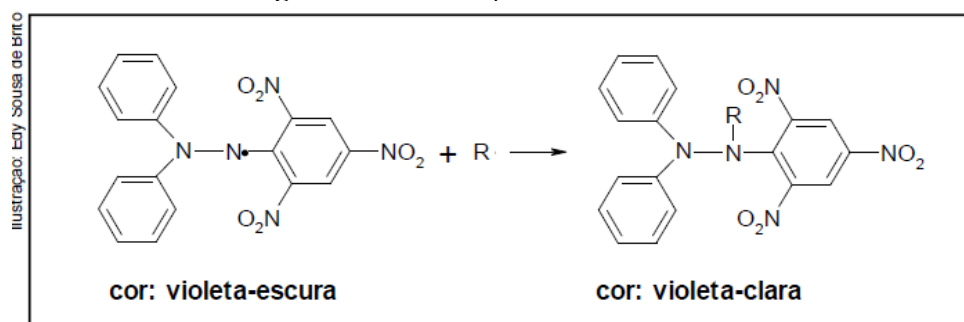
dos compostos e/ou extratos. Os métodos de varredura do radical DPPH e varredura do radical ABTS, avaliam a transferência de elétrons dos compostos presentes na amostra para o radical, já o método da capacidade redutora do ferro (FRAP) avalia o quanto os compostos presentes em determinada amostra são capazes de reduzir o ferro da sua forma férrica a ferrosa, os métodos do sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico e TBARs espontâneo avaliam a lipoperoxidação, o quanto determinados compostos são capazes de minimizar a peroxidação lipídica e o método de Redução do Óxido Nítrico (NO) que avalia a atividade antioxidante por meio da redução da produção de íons nitrito (DUARTE-ALMEIDA et al, 2006; SHAHIDI; ZHONG, 2015; BOROSKI et al., 2015; THOMAS, 2015).

2.3.1.1 Varredura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi desenvolvido por Blois (1958), adaptado por Brand-Williams et al. (1995). Tem como princípio a transferência de elétrons de um determinado composto antioxidante para um radical livre e baseia-se na captura do radical DPPH por compostos antioxidantes (Figura 7).

Este radical caracteriza-se pela sua estabilidade atribuída ao deslocamento do elétron desemparelhado por toda a molécula. O ato de se deslocar confere a esta molécula coloração violeta, sendo que ao ser reduzido, o composto perde sua tonalidade púrpura. A partir da quantificação desta mudança de coloração, é avaliada a capacidade redutora do antioxidante presente em determinado substrato (DUARTE-ALMEIDA et al, 2006; RUFINO et al., 2007; SHAHIDI; ZHONG, 2015; GHANI et al., 2017).

Figura 7- Estabilização do radical livre DPPH



Fonte: de Brito, 2007.

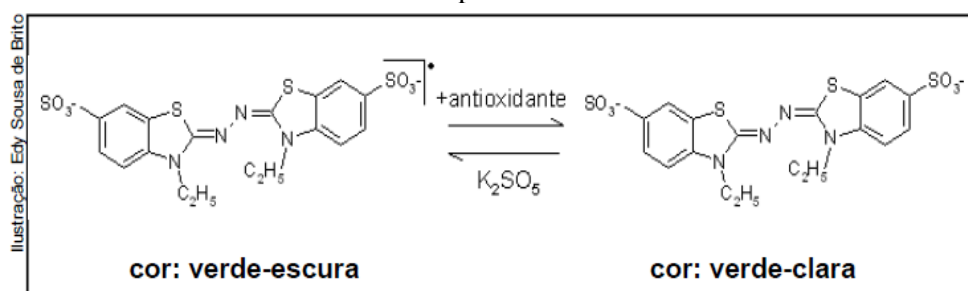
2.3.1.2 Captura do radical ABTS

O método de captura do radical radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS (Figura 8), foi criado por Miller et al. (1993) e desenvolvido por Re et al. (1999) é também chamado de método de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox ou ainda, TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), em situações em que este padrão é

utilizado para comparação. Este baseia-se na transferência de elétrons de compostos com atividade antioxidante para o radical, tornando-o um radical estável.

Basicamente, é possível analisar a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, que tem sido bastante aplicado para análise da atividade antioxidante de frutas, vegetais e óleos essenciais, visto que é um método prático, de alta acurácia e que faz uso de um radical estável. (KUSKOSKI et al., 2005; SANCHEZ-MORENO, 2002; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Figura 8- Estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



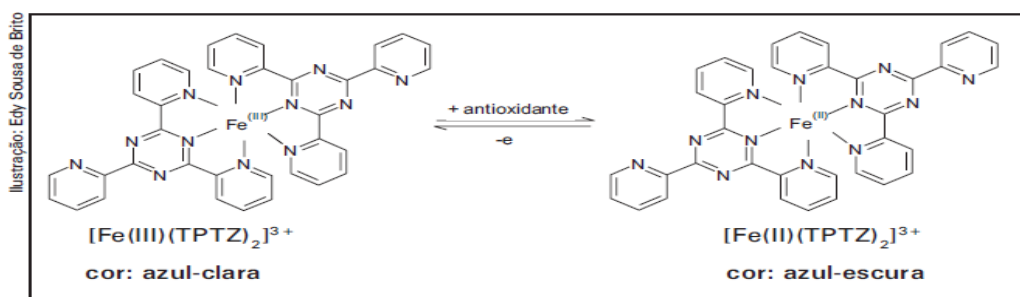
Fonte: de Brito, 2007.

2.3.1.3 Capacidade Redutora do Ferro (FRAP)

O método de capacidade redutora do ferro (FRAP) foi criado por Benzie e Strain (1996) e desenvolvido por Pulido et al. (2000), este mensura a capacidade de redução de uma substância por meio da redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^3 -TPTZ) ao complexo ferroso (Fe^2 -TPTZ) com absorção máxima de 593nm (Figura 9).

É considerada uma das mais reprodutíveis e apresenta elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos. Não obstante, antioxidantes que atuam por transferência de hidrogênio, principalmente tiols e carotenoides, não serão determinados por esta metodologia (RUFINO et al., 2006, BOROSKI et al., 2015; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Figura 9- Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} .



Fonte: de Brito, 2006.

2.3.1.4 Sistema β -caroteno/ácido linoléico

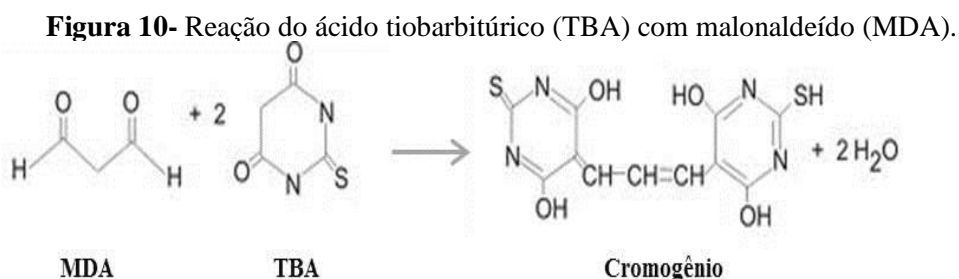
O sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico foi descrito inicialmente por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Neste método, a oxidação de uma emulsão composta de β -caroteno, ácido linoleico e água é medida por espectrofotômetro num comprimento de onda de 470nm.

Este método baseia-se na descoloração do β - caroteno, que é mediada pelos radicais livres formados pela oxidação do ácido linoleico (gerando hidroperóxido); estes hidrolisam as duplas ligações do β -caroteno, ocasionando rápida descoloração da solução na ausência de antioxidante. Quando se tem a presença de antioxidantes, a solução do β - caroteno é preservada da oxidação e a descoloração pode ser reduzida (HUANG; WANG, 2004; RUFINO et al., 2006; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

2.3.1.5 Peroxidação espontânea

O método de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi descrito inicialmente por Kohn e Liversedge (1944). Este método é utilizado para avaliar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados obtidos principalmente de cérebro de ratos, considerando tempo de reação, temperatura e presença de oxigênio.

No decorrer desse processo, dentre outros compostos, é formado o Malonaldeído (MDA). Nesta reação, o ácido tiobarbitúrico reage com MDA, formando pigmento rosado. Na presença de antioxidantes no sistema, a produção do MDA será reduzida e, conseqüentemente, haverá menor formação de composto cromogênio - o que pode ser acompanhado por leitura em espectrofotômetro num comprimento de onda de 532nm (Figura 10) (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; SUCUPIRA et al., 2012; GHANI et al., 2017).



Fonte: Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979).

2.3.1.6 Eliminação de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é um radical livre envolvido em diversos mecanismos fisiológicos como potente vasodilatador, no relaxamento muscular, na neurotransmissão e regulação

imune. Atua também em processos patológicos quando produzido em excesso. O método mais utilizado para avaliar a eliminação do óxido nítrico, baseia-se na produção de NO a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio em de tampão fosfato. Uma vez gerado, o NO interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que são medidos por meio da reação de Griess, por leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm (THÉROND et al., 2000; BASU; HAZRA, 2006; VASCONCELOS et al., 2007; THOMAS, 2015).

Neste é avaliado se o antioxidante presente no meio é capaz de eliminar o nitrito formado durante a reação (VASCONCELOS et al., 2007; THOMAS, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar quimicamente a casca e polpa de pitomba (*Talisia esculenta* (St. Hil.) Ralbk, incluindo os compostos bioativos, o perfil fenólico, a capacidade antioxidante *in vitro*, e avaliar o possível efeito citotóxico.

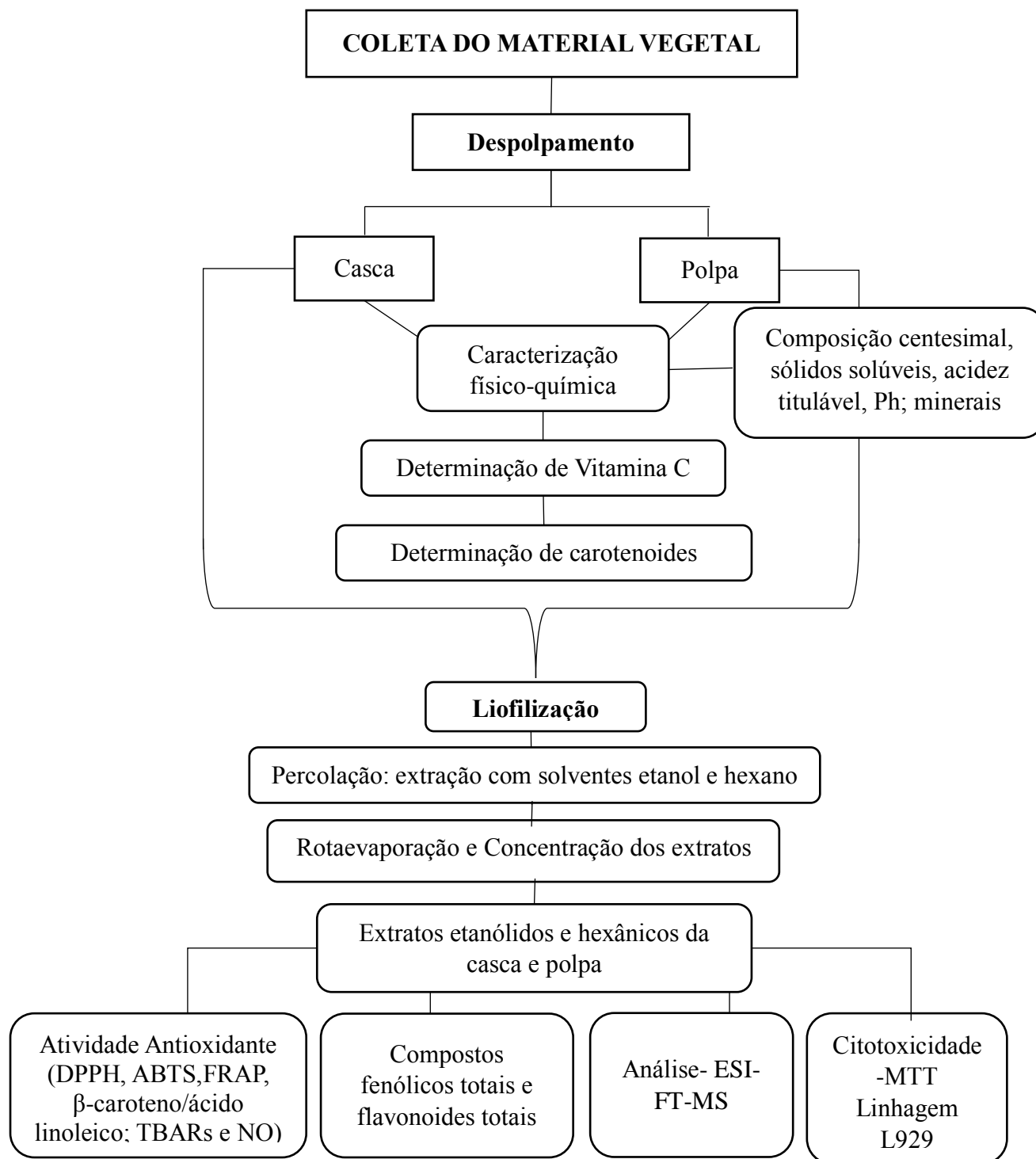
3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a composição centesimal e o teor de sólidos solúveis totais e acidez titulável;
2. Quantificar o teor de minerais (Ca, Fe, Zn, Mg, Cu, K e P), carotenoides totais e vitamina C;
3. Quantificar o teor de fenólicos totais e flavonoides totais;
4. Determinar a atividade antioxidante *in vitro* por diferentes métodos (DPPH, ABTS, FRAP, co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico, TBARs e NO);
5. Identificar o perfil químico dos EHex e EEtOH da casca e polpa da pitomba por espectrometria de massas - ESI-FT-MS.
6. Avaliar o efeito citotóxico em fibroblastos (células L929).

4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas para execução do presente estudo estão expostas na Figura 13.

Figura 13. Fluxograma metodológico



Fonte: Próprio autor, 2018.

4.1 Coleta do material vegetal

Os frutos da pitombeira foram coletados *in loco* na zona rural da cidade Areia Branca-SE (10°45'29" latitude sul e 37°18'45" longitude oeste, altitude de 193,0 metros), na safra 2017, no mês de abril (BONFIM; COSTA; BENVENUTI, 2002). Os frutos foram transportados para o Laboratório de Técnica e Dietética da Universidade Federal de Sergipe, onde foram higienizados e sanitizados com Hidrosteril®, segundo as instruções do fabricante. A casca e polpa foram separadas manualmente e armazenadas em freezer a -20°C para posteriores análises.

4.2 Reagentes utilizados

Álcool metílico (Êxodo científica P.A-ACS-99,8%); Álcool etílico (Alphapec P.A-99,8%); Clorofórmio (Synth PA A.C.S-99,8%); Sulfato de sódio anidro (Cinética P.A-99%); Verde de bromocresol (Synth P.A.-A.C.S); Vermelho de metila (Synth P.A.-A.C.S.); Ácido sulfúrico (Synth PA A.C.S-98%); Ácido bórico (Synth P.A. – A.C.S- 99,5%); Ácido clorídrico (Cinética P.A-37%); Hidróxido de sódio (Cinética P.A-97%); Fenolftaleína (Synth P.A.-A.C.S); Ácido oxálico (Synth P.A.-A.C.S-99,5%); 2,6-diclorofenolindofenol dihidratado ((DCFI) VETEC P.A-98%), Ácido L-ascórbico (Synth P.A-A.C.S-99%); Carbonato de cálcio (Impex P.A-98,7%), Acetona (Êxodo Científica P.A-A.C.S-99,5%), Hexano (NEON-P.A-99,8%); Folin Ciocalteu (Dinâmica P.A-CAS); Carbonato de sódio Anidro (Vetec P.A-99,5%); Ácido gálico (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S 99%); 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ((DPPH) Sigma-Aldrich P.A-98%); 2,2-Azino-Bis-(Ácido 3 – Etilbenzotiazolina-6-Sulfônico((ABTS) Sigma –Aldrich-98%); Persulfato de potássio (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S-99%); Nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S-99%); Ácido acético (Synth P.A-A.C.S.ISO-99,5%); ácido fosfórico (Synth P.A-A.C.S-85%); Sulfato de ferro II heptahidratado (NEON P.A-99%); 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine ((TPTZ) Sigma- Aldrich P.A-99%); Cloreto férrico (Dinâmica P.A-A.C.S-97%); Ácido tiobarbitúrico ((TBA) MPbiomedicals, LLC); 1,1,3,3-tetraetoxiopropano ((TEP)- Sigma-Aldrich P.A-96%); Cloreto de alumínio (Sigma-Aldrich Reagent Plus-99%); Nitrito de sódio (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S-99%); β-caroteno (Fluka P.A-97%); Ácido linoleico (Sigma P.A-99%); Tween 20 (Sigma-Aldrich P.A-99%); Ácido nítrico (Synth P.A-A.C.S-70%); Sulfalinamina (Sigma P.A-99%); N-diclororidrato de (1-naftil) etilenodiamina (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S-98%); Catequina (Sigma P.A.-99%; 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid ((Trolox) Sigma- Aldrich P.A-97%).

4.3 Métodos

4.3.1 Caracterização físico-química

A determinação de cinzas, umidade, proteínas, lipídios, carboidratos, sólidos solúveis totais (SST), pH e acidez total titulável (ATT) foram realizadas de acordo com as técnicas da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). O valor energético total (VET) das amostras foi calculado, considerando-se os fatores de conversão de Atwater para proteína (4 Kcal/g), carboidratos (4Kcal/g) e 118 lipídios (9Kcal/g) (MERRILL; WATT, 1973).

4.3.2 Determinação de minerais

A determinação de minerais da polpa e da casca *in natura* foi realizada em triplicata por espectrometria de absorção atômica com chama dos referidos minerais em uma amostra representativa do alimento, previamente digerida, seguindo as técnicas do Instituto Adolfo Lutz (2005), foram feitas análises de cálcio, zinco, cobre, ferro, fósforo, magnésio e potássio (método nº 394/IV).

4.3.3 Vitamina C

A determinação de vitamina C da casca e polpa da pitomba foi realizada em triplicata por titulometria (AOAC, 1998) com solução de ácido oxálico 2% e titulada com solução de 2,6-diclorofenol-indofenol, previamente padronizada com solução de ácido ascórbico (método nº 967.21).

4.3.4 Carotenoides totais

A análise foi realizada em triplicata com a casca e a polpa da pitomba. 2 g de amostra *in natura* foram homogeneizados com 0,2 g de carbonato de cálcio e 7 mL de acetona 80%, em seguida, a mistura foi filtrada em papel filtro (Unifil diâmetro de 9 cm) diretamente em balão volumétrico âmbar. O resíduo foi lavado duas vezes com acetona 80%, e a solução, completa para 25 mL com acetona 80%.

Para o cálculo dos carotenoides totais, inicialmente, foi estimado o teor de clorofila a partir das leituras de absorbância do filtrado em espectrofotômetro (Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA) a 647 e 663 nm. Pelo qual:

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{647} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = 21,50 \times A_{647} - 5,10 \times A_{663} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{Clorofila total (T)} = 7,15 \times A_{663} - 18,71 \times A_{647} \quad (\text{Equação 3})$$

Na determinação de carotenoides, foi utilizado o mesmo filtrado obtido para clorofila. As leituras das absorbâncias foram realizadas, em triplicata, a 647, 663 e 470 nm e a concentração foi estimada conforme a equação:

$$\text{Carotenóides} = \{1000 \times A_{470} - (1,82 \times Ca - 104,96 \times Cb)\} / 198 \quad (\text{Equação 4})$$

A concentração de pigmentos obtidos inserindo os valores de absorbância foi expressa em $\mu\text{g/mL}$ do extrato da planta (LICHTENTHALER, 1987).

4.3.5 Obtenção de extratos

Os extratos foram obtidos por percolação exaustiva de forma sequencial utilizando dois solventes: hexano (extrato hexânico da casca – EHexC, e extrato hexânico da polpa – EHexP) e etanol (extrato etanólico da casca – EEtOHC, e extrato etanólico da polpa – EEtOHP). Para tanto, 50 gramas de casca e 50 gramas de polpa foram liofilizados e colocados em percoladores com 200 mL de hexano por 48 horas, após esse período foram rotaevaporados (Rotaevaporador Fisatom-801) e concentrados em concentrador de extratos à vácuo (Concentrador de amostras a vácuo - RVC 2-33), posteriormente, à mesma amostra foram adicionados 200 mL de etanol que também permaneceu por 48 horas no percolador e após esse período foram rotaevaporados e concentrados (NAVARRO, 2005).

4.3.6 Determinação de Compostos fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu, seguindo o procedimento descrito por Swain e Hills (1959), com algumas modificações. Foram transferidos 12,5 μL de cada extrato em triplicata (EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP) para microplaca (CralPlast-96 poços) e adicionado 200 μL de água destilada e 12,5 μL de reagente de Folin-Ciocalteu. A solução foi homogeneizada em vortex mixer (Labnet), e após 3 minutos da reação foram acrescidos 25 μL de solução saturada de carbonato de sódio, novamente homogeneizando a solução. Após 1 hora de repouso, foram realizadas as leituras de absorbância em leitor de placas multi (Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA) a 720 nm. O ácido gálico foi utilizado para a curva padrão (12,5 a 200 μg) e os resultados, expressos em equivalentes de ácido gálico.

4.3.7 Determinação de Flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi quantificado de acordo com método de Jia, Tang e Wu (1999), com adaptações para microplacas. Em microplaca (CralPlast-96 poços) foram pipetados em triplicata 25 μL de cada extrato (EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP) e adicionados 100 μL de água destilada e 7,5 μL de NaNO_2 (5%), após 6 minutos, foram

acrescidos 7,5µL AlCl (10%) e após 6 minutos, 100 µL de NaOH (4%) e 10µL de água destilada. Depois de 15 minutos, foi realizada a leitura da absorbância a 510 nm em leitor de placas multi (Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA). Para controle negativo utilizou-se água destilada em substituição da amostra. Os resultados foram expressos em equivalentes de catequina (curva padrão de catequina nas concentrações de 12,5-200µL/mL).

4.3.8 Atividade antioxidante *in vitro*

As análises foram realizadas com todos os extratos (EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP) em triplicata.

4.3.8.1 Varredura do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio do radical DPPH• conforme método empregado por Blois (1958) e Brand-Willians et al. (1995) com modificações. Alíquotas de 50 µL de cada extrato, em diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL) foram transferidas para microplacas (CralPlast-96 poços) e foram adicionados 150 µL de solução metanólica de DPPH• a 6×10^{-5} mol/L. A redução do radical DPPH• foi medida a 515 nm em leitor de placas multi (Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA), logo após 30 minutos de repouso. O decréscimo nos valores de absorbância das amostras foi correlacionado com a do controle (metanol) e, estabelecido o percentual de varredura do radical DPPH• expresso pela equação:

$$\% \text{ de varredura} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.3.8.2 Captura do radical ABTS

Em microplaca (CralPlast-96 poços), 30µL da amostra em diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL) foram adicionados a 300µL do radical ABTS• (que corresponde a 5 mL da solução estoque de ABTS a 7mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio a 140 mM). As leituras de absorbância foram realizadas no tempo de 0, 6 e 15 minutos em leitor de placas multi (Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA) a 734 nm (RE, *et al.*, 1999). Os resultados foram expressos como percentagem de varredura do radical ABTS• pela seguinte equação:

$$\% \text{ de varredura} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

4.3.8.3 Eliminação de óxido nítrico (NO)

O NO foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (SNP, 20 mmol/L) em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4). Uma vez gerado, o NO interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos por meio da reação de Griess, de acordo com o método de Basu *et al.* (2006) com modificações.

Em microplaca (CralPlast-96 poços) foi adicionada a mistura reacional contendo 50 µL da amostra em diferentes concentrações (0,25; 0,5; 1; 2mg/mL) e 50 µL SNP (20 mmol/L) em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4), incubada a 37°C, por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm em leitor de placas multi (Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA) e os resultados, expressos em quantidade de íons nitrito produzida.

4.3.8.4 Capacidade Redutora do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada conforme Oyaizu (1986) com algumas modificações. Alíquotas de 9 µL de cada extrato em diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL) foram pipetadas em microplaca (CralPlast-96 poços), e em seguida acrescidos 27µL de água destilada e 270µL do reagente FRAP (preparado apenas no momento da análise, correspondendo a solução de: 25 mL de tampão acetato 0,3 M; 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). A placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos e a leitura foi realizada a 595 nm em leitor de placas multi (Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA). O sulfato ferroso (FeSO₄) foi utilizado como padrão e os resultados, expressos em µM de equivalentes de sulfato ferroso produzido (SINGHAL, PAUL E SINGH, 2014).

4.3.8.5 Sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante dos extratos EHex e EEtOH obtidos da polpa e casca de pitomba foi mensurada de acordo com o método descrito por Miller (1971) com modificações. Para o meio de reação foram colocados em béquer 200µL de solução de β-caroteno (2mg/mL) + 10µL de ácido linoleico + 50 µL de Tween 20 + 500µL de clorofórmio, após a evaporação do clorofórmio em capela, adicionou-se a essa mistura 25 mL de água destilada saturada em O₂ após evaporação do clorofórmio. Deste meio de reação alíquotas de 250µL foram transferidas para microplacas (CralPlast-96 poços) contendo as amostras em diferentes concentrações (0,5; 1; 2,5; 5; 10 mg/mL).

Todas as determinações foram acompanhadas de um controle sem antioxidante. Os valores da densidade ótica foram obtidos no tempo zero e 120 minutos depois, enquanto as amostras foram mantidas em banho-maria a 50°C, em leitor de placas multi (Detection

microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de proteção da oxidação.

O decaimento da densidade ótica do controle ($Abs_{inicial} - Abs_{final}$) foi considerado como 100 % de oxidação (MILLER, 1971; MOREIRA; MANCINI- FILHO, 2004). A partir desta relação, o decréscimo na leitura da absorbância das amostras foi correlacionado com o controle, estabelecendo desta forma, o percentual de proteção da oxidação das amostras pela equação:

$$\% \text{ de proteção da oxidação} = 100 - [(Abs_{amostra} \times 100) / Abs_{controle}] \quad (\text{Equação 3})$$

4.3.8.6 Peroxidação espontânea em homogenato de cérebro de rato

Neste ensaio foi empregado cérebro de rato *Wistar* macho de um estudo anterior com a pitaya e mangaba, sob responsabilidade da professora Dr^a Elma Regina de Andrade Wartha, previamente avaliado e aprovado pela Comissão de Experimentação em Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (Protocolo 07/2017-Anexo1). O animal foi anestesiado e após decapitação, o cérebro foi imediatamente lavado com NaCl 0,9% frio e homogeneizado na proporção de 1:1,5 (g de tecido: mL de tampão fosfato – 50 mM, pH 7,4).

O homogenato foi centrifugado a 3500 rpm a -4°C (Centrifuge 5427 R, refrigerada) durante 15 minutos e o sobrenadante obtido, contendo ácidos graxos poliinsaturados, foi utilizado. Para a quantificação de TBARS 100 µL de homogenato de cérebro de rato foram incubados com 50 µL de diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20mg/mL) de cada extrato, a 37°C, durante 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 350 µL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,36%) e, incubados por 1 hora a 85°C. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e centrifugados a 500xg durante 15 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placas multi (Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA) a 532 nm. Foi usado como padrão externo o 1,1,3,3-tetraetoxiopropeno (TEP) e o nível de peróxidos lipídicos, expresso como µmol de TBARS por mL de extrato (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

4.9 Análise em espectrometria de massas - ESI-FT-MS Exactive Plus

Os EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP da pitomba foram analisados por ionização, por eletrospray e espectrometria de massas com transformada de Fourier nos modos de íons positivo e negativo (ESI-FT-MS). Estas análises foram realizadas dissolvendo a amostra numa mistura de tolueno/metanol (1: 1 v/v) para produzir solução final de 5 ppm. Os dados

do ESI-FT-MS foram coletados em espectrômetro de massas HCD (dissociação colisional de alta energia) Exactive Plus (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com as seguintes condições: tensões capilares a +3,8 e -3,2 kV, nível de RF S-lente em 80 e temperatura capilar em 320 °C.

Nitrogênio foi usado como gás de nebulização. A aquisição espectrômetro de massas (MS) foi operada no modo Full Scan MS com uma resolução de 140.000 FWHM em 200 m/z na faixa de m/z 150-1800. Usando o software Xcalibur 3.0 e um total de 150 μ scan acumulado em cada execução. Os espectros finais de massas para cada amostra foram obtidos a partir da subtração de espectros de massas do branco do solvente. A identificação dos íons em modo negativo foi obtida comparando os valores de m/z nos espectros de massa obtidos por ESI(-)-FT-MS com uma biblioteca de compostos do software PetroMS. A correspondência de fórmula molecular foi considerada quando o erro de massa entre m/z experimental e m/z teórico do valor da biblioteca foi menor que 3 ppm (Rathsack, Kroll, & Otto, 2014).

4.10 Citotoxicidade

Linhagem celular

A linhagem celular L929 (fibroblasto) foi cultivada em meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) e mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C.

Preparação das células

As células foram desprendidas da garrafa de cultivo celular com a utilização de Tripsina a 0,25% (dissolvida em meio DMEM), contadas e colocadas em placas de 96 poços numa concentração de 2×10^4 células/poço. Após um período de 24 horas de incubação em estufa, para adesão das células a placa, as células foram tratadas com os EEtOH da casca e da polpa da Pitomba nas concentrações de 200 μ g/mL a 12,5 μ g/mL por 24h. Após 24h de tratamento foi realizado o ensaio de citotoxicidade por Methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT).

Ensaio de MTT

O ensaio consiste na redução do MTT pela mitocôndria das células viáveis, em cristais de Formazan de coloração azulada. A placa foi lavada duas vezes com PBS e em seguida foram adicionados 200 μ L do MTT em cada poço, a placa foi então incubada por 3 horas, o MTT foi retirado e dissolvido com DMSO por 10 minutos para ser lido em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm. (ALLEY et al., 1988; DENIZOT;

LANG, 1986; MOSMANN, 1983). O resultado foi expresso em % de viabilidade celular, pela equação abaixo

$$\% \text{ de viabilidade celular} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}} \times 100) \quad (\text{Equação 4})$$

4.11 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para análise estatística dos dados, foram utilizados a ANOVA pós teste de Tukey ($p < 0,05$) (para analisar a proporção do fruto inteiro e suas frações, flavonoides totais, fenólicos totais, atividade antioxidante e citotoxicidade) e o Teste T student ($p < 0,05$) (para análise da diferença da composição centesimal, minerais, vitamina C e carotenoides da casca e polpa), usando-se o software Graphpad Prism (versão 6.0). Os dados obtidos a partir da análise em espectrômetro de massas ESI(-)-FT-MS foram processados no software PetroMS (versão 2.3.0).

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, M. T.; NOVAES, G. M.; SILVA, D. B.; VILEGAS, W. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 398-406, 2013.
- ALU'DATT, M.H. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, n. 218, p. 99-106, 2017.
- ALLEY et al. M.C. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. **Cancer Research**, v.48, p. 589-601, 1988.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.
- AOAC-Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC**. Washington, cap. 37, p. 4-7, 1995.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Peer-verified methods program**. Manual on policies and procedures. Gaithersburg, p. 35, 1998.
- BARBA, F. et al. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. **Trends in Food Science & Technology**, 2017.
- BASTOS, D.H. M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.53, n. 5, 2009.
- BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 10, p. 896-900, 2006.
- BEECHER, G.R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. **The Journal of Nutrition**, p 3248 – 3254, 2003.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, p. 9-19, 2012.

BONFIM, L.F.C.; COSTA, I.V.G.; BENVENUTI, S.N.P. Projeto Cadastro da Infra-Estrutura Hídrica do Nordeste: Estado de Sergipe. Diagnóstico do Município de Areia Branca. Aracaju: CPRM. 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BREST, C. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, p. 287-299, 2011.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v.71, p. 107-120, 2018.

CHIKARA, S. et al. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. **Cancer Letters**, v. 413, p. 122-134, 2018.

CORRÊA, V.G. et al. Estimativa do consumo de compostos fenólicos pela população brasileira. **Rev. Nutr.**, v. 28, n. 2, p. 185-196, 2015.

DASGUPTA, A.; KLEIN, K. Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements. **Elsevier**, p.129-147, 2014.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DENIZOT, F., LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v.89, p. 271-277, 1986.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β - caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais dpsh. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 26, p. 446-452, 2006.

ÉDER-SILVA, E. **Frutíferas nativas do Nordeste**: Qualidade fisiológica, morfológica e citogenética. 2006. 110 p (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba.

FRANCISQUETI, F.V. The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. **Rev Assoc Med Bras**, v. 63, n. 1, p. 85-91, 2017.

FREIRE, M.G.M. et al. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v. 42, p. 275-280, 2003.

FREIRE, M. et al.. Characterization of a saccharide-binding protein from *Talisia esculenta* seeds with trypsin inhibitory activity. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 12, p. 1557-64, 2009.

FREIRE, M. et al. Structural insights regarding an insecticidal *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval control. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 161, n. 1, p. 86-92, 2012.

FRESHNEY, I. Basic Principles of Cell Culture. In: (Ed.). **Culture of Cells for Tissue Engineering**, 2006.

GARCEZ, M. et al. Radicais livres e espécies reativas. In: SALVADOR, M.; HENRIQUE, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. **Ulbra**, Canoas, 2004. p. 13-33.

GASPAROVIC, A.C.; ZARKOVIC, N.; BOTTARI, S.P. Biomarkers of nitro-oxidation and oxidative stress. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 73-80, 2018.

GHANI, M.A. et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**, 2017.

GIADA, M.L.R. Uma abordagem sobre a capacidade antioxidante in vitro de alimentos vegetais e bebidas. **Demetra**, v.9, n.1, p. 137-146, 2014.

GIULIETTI, A. M. et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. Biodiversidade da Caatinga: ações prioritárias para conservação. 47-90 p. 2004.

GOBBO, N. L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

GONDIM, P. J. *et al.* Qualidade de frutos de acessos de umbu-cajazeira (*Spondias* sp.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 11, p. 1217-1221, 2013.

GOUVEIA, SILAS DA SILVA ; LIMA, ADEÂNIO ALMEIDA. Insert relation ship between reactive species of oxygen and Carcinogenic promotion. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.20, n.3, p.174-179, 2017.

GRZESIK, M. *et al.* Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, p. 480-492, 2018.

GUARIM NETO, G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V. B. D. Notas etnobotânicas de espécies de *Sapindaceae* Jussieu. . **Acta Bot. Bras.**, v. 14, n. 3, p. 327-334, 2000.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E.P. *et al.* Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. **Plants**, v. 7, n. 2, 2018.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 1, p. 1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 5th ed. **Oxford**: Oxford University Press, 2015.

HAMINIUK, C.W. I. *et al.* Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1-22, 2012.

HARRINGTON, M. G. *et al.* Phylogenetic inference in Sapindaceae sensu lato using plastid matk and rbcL DNA sequences. **Systematic Botany**, v. 30, p. 366-382, 2005.

HORN, R.C. *et al.* Obesity, bariatric surgery and oxidative stress. **Rev Assoc Med Bras**, v. 63, n. 3, p. 229-235, 2017.

HUANG, H. L.; WANG, A. G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4993-4997, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. v.1, 4 ed. Brasília, 2005. 1018p.

JIA, Z., TANG, M.; WU, J. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

KLAUNIG, J.E.; WANG, Z. Oxidative stress in carcinogenesis. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 116-121, 2018.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LEE, W.L.; HUANG, J.Y.; SHYUR, L.F. Phytoagents for Cancer Management: Regulation of Nucleic Acid Oxidation, ROS, and Related Mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 20, n.13, p. 1-22, 2012.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER, L., DOUCE, R. (Eds.) **Methods in Enzimology**. London: Academic Press, v.148, p.350-81, 1987.

MARIN, A. M.; SIQUEIRA, E. M.; ARRUDA, S. F. Minerals, phytic acid and tannin contents of 18 fruits from the Brazilian savanna. **Int J Food Sci Nutr**, v. 60, n. 7, p. 180-90, 2009.

MILLER, H. E. Simplified method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 48, n. 2, p. 1-91, 1971.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MENG, D. Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. **Journal of Functional Foods**, v.37, p. 467-479, 2017.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

NAVARRO, D. D. F. **Estudo químico biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial**

terapêutico. 2005. 293 p (Doutorado). Centro de Ciências Físicas e Matemáticas Curso de Pós Graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina.

NERI-NUMA, I. A. et al. Preliminary of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia Esculenta*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 1233-1238, 2014.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.
OLIVEIRA, D. M. de; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011 .

OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. C. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, p. 146-152, 2012.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PULIDO, R. et al. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RATHSACK, P.; KROLL, M.M.; OTTO, M. Analysis of high molecular compounds in pyrolysis liquids from a german brown coal by FT-ICR-MS. **Fuel**, v. 115, p.461–468.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REIS, R.C. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante de variedades melhoradas de mamão. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.45, n.11, p.2076-2081, 2015.

RUFINO, M.S.M. et al. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007a. 4p, (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 127).

RUFINO, M.S.M. et al. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007b. 4p, (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128).

RUFINO, M.S.M. et al. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006 a. 4p, (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 125).

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121–137, 2002.

SALAZAR, M.M. Técnicas para la detección de apoptosis y senescência celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. **Rev. colomb. Biotecnol**, v. 11, n. 2, 2009.

SAMET, J.M.; WAGES, P.A. Oxidative stress from environmental exposures. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 60-66, 2018.

SANTOS, T. C.; JÚNIOR, J. E. N.; PRATA, A. P. N. Frutos da Caatinga de Sergipe utilizados na alimentação humana. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2012.

SANTOS, W. L. D. et al. Effect of the Aqueous Extracts of the Seeds of *Talisia esculenta* and *Sapindus saponaria* on Fall Armyworm. **Brazilian Archives of biology an technology**, v. 51, n. 2, p. 373-383, 2008.

SARANGARAJAN, R.. Antioxidants: Friend or foe? Asian Pacific. **Journal of Tropical Medicine**, v.10, n. 12, p. 1111-1116, 2017.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In Oxidative stress. Edited by Sies H, **London: Academic Press**, p1–8, 1985.

SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v.7, p. 122-126, 2018.

SILBERBERG, M. et al. The bioavailability of polyphenols is highly governed by capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. **Eur. J. Nutr.**, 45, p.88-96, 2006.

SILVA, K. F. **Sapindaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. 2011. 148 p. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, M.L.C. et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, M. R. et al. Chemical characterization of native species of fruits from savanna ecosystem. **Ciência Rural, Santa Catarina**, v. 38, n. 6, p. 1790- 1793, 2008.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H.P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 121-127, 2014.

SOETHE, C. S. et al. Qualidade, compostos fenólicos e atividade antioxidante de amoras-pretas 'Tupy' e 'Guarani' armazenadas a diferentes temperaturas. **Pesq. agropec. bras.**, v. 51, n. 8, p. 950-957, 2016.

SOUZA, M. P. et al. Phenolic aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk) assessed by LC-MS/MS and HS-SPME/GC-MS. **Food Research International**, v. 83, p. 87-94, 2016.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Unopar Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punns domestica*. I. quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63-68, 1959.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

THÉRON, P. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 3, p. 373-384, 2000.

THOMAS, D. Breathing new life in to nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. **Redox Biology**, v. 5, p. 225-233, 2015.

THOMSON, J.A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science New Series**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TURECK, C. et al. Avaliação da ingestão de nutrientes antioxidantes pela população brasileira e sua relação com o estado nutricional. **Rev Bras Epidemiol**, v.20, n.1, p. 30-42, 2017.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v.2, p. 1231-1246, 2010.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 105-113, 2015.

VIEIRA, F.A.; GUSMAO, E. Biometria, armazenamento de sementes e emergência de plântulas de *Talisia esculenta* Radlk. (Sapindaceae). **Ciênc. agropec.**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1073-1079, 2008.

VIRGOLIN, L.B. et al. Composition, content of bioactive compounds, and antioxidante activity of fruit pulps from the Brazilian Amazon biome. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.52, n.10, p.933-941, 2017.

WALTER, L.C.; ROSA, H.T.; STRECK, N.A. Mecanismos de aclimação das plantas à elevada concentração de CO₂. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.9, p.1564-1571, 2015.

ARTIGO I

***Talisia esculenta* (A. ST.-HIL.) Radlk: Physico-Chemical Characteristics and Antioxidant and Biological Activities.**

(Artigo submetido e nas normas da revista Plant Food for Human Nutrition)

1 **Name(s) of author(s)**

2 Layanne Nascimento. Fraga; Izabela Maria Montezano de Carvalho.

3 **Full Title: *Talisia esculenta* (A. ST.-HIL.) Radlk: Physico-Chemical Characteristics,**
4 **Antioxidant Activity and Biological Activity.**

5 **Contact information for corresponding author**

6 Izabela Maria Montezano de Carvalho.

7 Adress: Av. Marechal Rondon, S/n - Jardim Rosa Elze, São Cristóvão - SE, 49100-000.

8 Phone/Fax: (79) 31946567.

9 E-mail: i.montezano.c@gmail.com

10 **All other author affiliations**

11 Sergipe Federal University.

12 Adress: Av. Marechal Rondon, S/n - Jardim Rosa Elze, São Cristóvão - SE, 49100-000.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

Abstract

Talisia esculenta (A. ST.-HIL.) Radlk is a Brazilian wild fruit, known as a pitomba, belonging to the Sapindaceae family. The objective of the present work was to perform a review of the literature in order to identify studies on its physico-chemical characterization, antioxidant activity and biological activity. The articles search was done in PubMed, SciELO, Science Direct and LILACS. We identified 90 publications, 8 in SciELO, 3 in LILACS, 67 in Science Direct and 12 in PubMed. Subsequently, duplication of the articles between the databases was verified, and the triage was done by reading the titles, abstracts and reading in full, to analyze which articles fit the study objective, and only 5 studies were included. The review exposes *Talisia esculenta* Radlk (A. ST.-HIL.) as a fruit that has a bioactive potential, but there is a shortage of studies that deal with its chemical composition and its biological activity.

Keywords: pitomba; antioxidant activity; biological activity; bioactive compounds.

44 **Abbreviations**

- 45 ABTS 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
- 46 AOAC Official Methods of Analysis
- 47 CNCD Chronic non-communicable diseases
- 48 DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- 49 GAE Equivalent in gallic acid
- 50 GC-MS Gas chromatography coupled to mass spectrometry
- 51 HPLC High Performance Liquid Chromatography
- 52 LC-MS/MS Liquid chromatography coupled to mass spectrometry
- 53 NCI-ADR/RES Tumor cell (breast expressing multiple drug resistance phenotype)
- 54 ORAC Oxygen Radical Absorbance Capacity
- 55 OVCAR-3 Tumor cell (ovary)
- 56 UACC-62 Tumor cell (melanoma)
- 57 TEL lectin from the seed of *Talisia esculenta*;
- 58 TCV Caloric value total
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63

64 Introduction

65 Brazil is the most biodiverse country in the world and the third largest producer of
66 fresh fruits globally. This fact notoriously contributes to the economy of the country. Some of
67 its richest biomes by the number of plant species are the Amazon, Atlantic rainforest,
68 Cerrado, and Caatinga [1,2,3]. Despite the great diversity of native plant species, many of
69 them still remain unresearched or even unknown. Furthermore, an increased interest in natural
70 or minimally processed products has been observed, particularly due to the benefits associated
71 with regular consumption of such foods. The importance of this food habit is currently
72 recognized because it can reduce the risk of chronic non-communicable diseases (CNCD)
73 [4,5,6].

74 *Talisia esculenta* A.St.-Hil Radlk of the Sapindaceae family is among the lesser
75 known Brazilian fruits. It is commonly known as “pitomba”. Its tree reaches height of 6 to 12
76 m and the diameter of the trunk varies between 30 and 40 cm [7]. The fruit has a thick peel
77 and elongated seeds with reddish spots [8].

78 Pitomba is characterized as a fruit of Brazilian wilderness, encountered most often in
79 Brazilian biomes of Caatinga, Cerrado, and Atlantic rainforest as well as in the neighboring
80 countries: Bolivia and Paraguay [8,3,9]. Its fruition is annual and produces moderate quantity
81 of seeds; flowering occurs from August to October and ripening of fruits is from January to
82 March depending on the locality [7].

83 The fruit of pitomba represents a known economic potential. It is sold *in natura* in
84 open markets of the Northern and Northeastern regions of Brazil and it is well accepted by the
85 population of the Northeastern region. Its pulp is used in production of jams, jellies, and
86 sweets with a flavor similar to an apricot (*Prunus armeniaca* L., Rosaceae) [8,9]. The seeds
87 have been extensively studied as a source of compounds with insecticidal activity [10, 11, 12].

Nevertheless, studies that treat the fruit as food, characterize it, and determine its antioxidant and biological activities are scarce. Some recent articles point to pitomba as being a likely source of bioactive compounds [13,14].

In view of the above, the objective of this research was to perform a review of literature about the fruit of the species of *Talisia esculenta* Radlk to identify studies that address its physico-chemical characteristics, antioxidant and biological activities.

Research Methodology

This survey was conducted from September to October 2016 and included articles published in the last 15 years (from 2001 to 2016) that were obtained from the following databases: PubMed, SciELO, Science Direct, and LILACS. “*Talisia esculenta*” and “pitomba” were used as search terms and combined using the “and” operator with: “centesimal composition”, “antioxidant activity”, “phenolic compounds”, and “cell culture”. Original studies of the basic experimental and/or applied type that analyzed the composition of pitomba (*Talisia esculenta* Radlk) and its *in vitro* and *in vivo* effects were included in this review. Excluded were articles about biological control of pests, botany, and biometrics of pitomba. The following steps were performed for selecting the articles after defining the inclusion and exclusion criteria: verifying duplication of the articles between databases and sorting by reading of the titles, reading of the abstracts, and reading in full. The inclusion criteria allowed publications in English, Spanish, and Portuguese.

Compilation of Studies

Search Results for Scientific Articles

90 articles were identified in the databases participating in this research. Out of these, 7 were duplicated between the databases, bringing the number of articles qualifying for further investigation in the selection to a total of 83. Among the articles that were not

adhering to the inclusion criteria, 75 were excluded after the examination of their titles, 2 after the analysis of the abstracts, and 1 was excluded after the in-depth reading. Ultimately, the search resulted in 5 studies suitable for analysis in this review. The complete process for the selection of the articles is detailed in Figure 1.

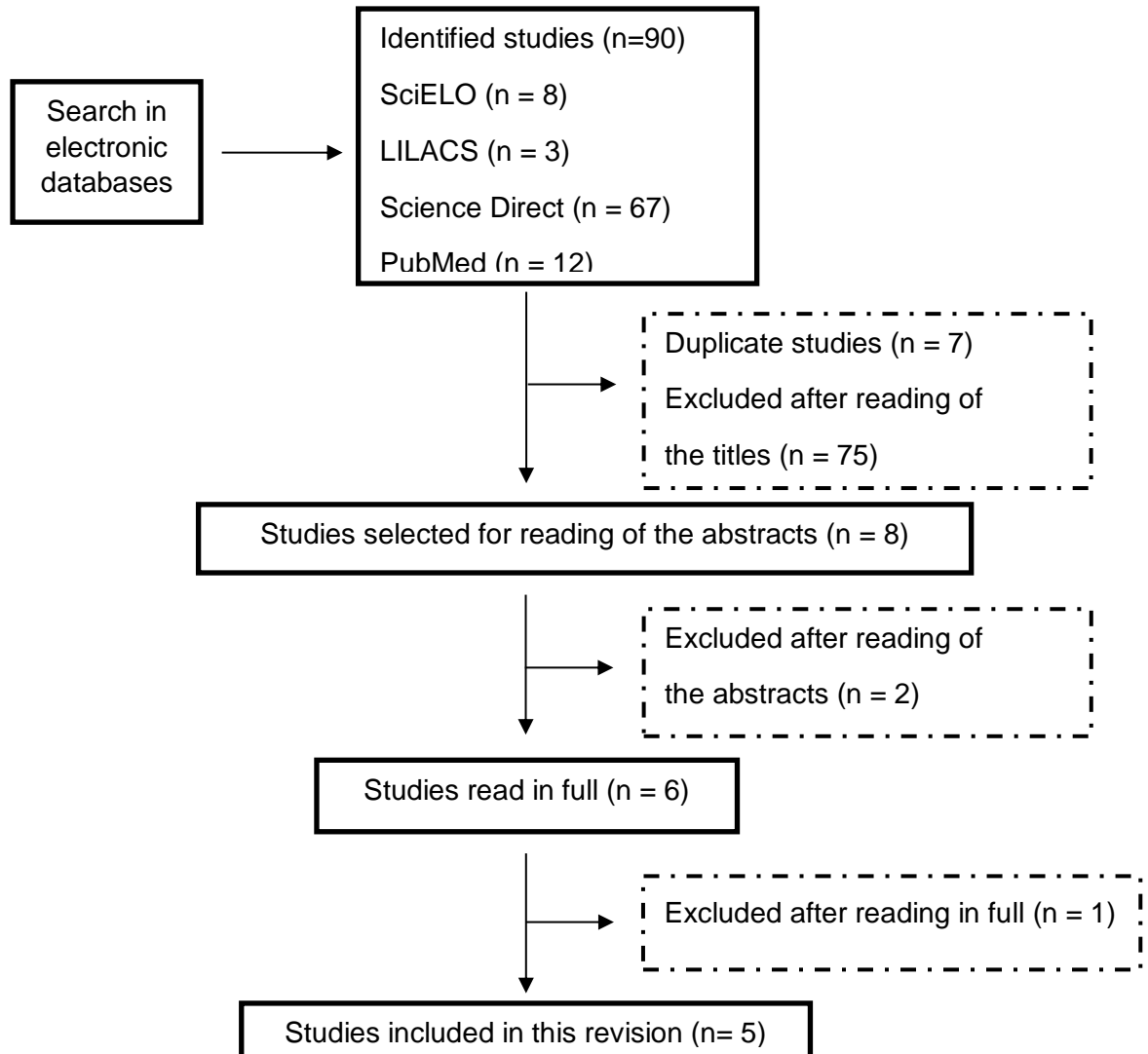


Fig. 1. Flowchart of electronic search and inclusion of the articles for this study.

Out of the 5 selected articles, 2 works examined the physical-chemical composition [15, 16]; 2 works analyzed the antioxidant activity and *in vivo* and *in vitro* effects [13, 14]; and 1 work evaluated the inflammatory potential *in vivo* [17]. Table 1 presents a summary of the characteristics of the selected articles. It is evidenced that all the studies were carried out in Brazil, being collected mainly in the Amazon region and in the cerrado.

133 Table 1. Summary of the studies included in the systematic review.

Authors/ Year of publication/ Country	Variables studied	Part of the fruit Analyzed	Model	Methods Used	Results
Freire et al 2003, Brazil.	Lectin, leukocyte migration, inflammatory response.	Seed	<i>In Vivo</i>	Isolation of lectin; air bag model produced on the dorsal skin of rats; induction of edema in the subplantar region of the right hind paw by injection of TEL .	The accumulation of neutrophils in the air pocket was dose-time dependent with a maximum response at 16 hours. The maximum accumulation of mononuclear cells was observed at 24 hours after the TEL injection. Accumulation of neutrophils was observed when this lectin was injected in the peritoneal cavity of the mouse, although the recruitment of maximum mononuclear cells was observed 48 hours after the TEL injection.
Silva et al 2008, Brazil.	Moisture, protein, total lipids, total dietary fiber, ash, calcium, iron, zinc.	Pulp	<i>In Vitro</i>	Moisture at 105°C. Protein by total nitrogen method (Kjeldahl flask). Lipids - technique described by Bligh and Dyer (1959) and the total food fiber content by enzymatic-gravimetric method of Prosky (1988). Ash after incineration in muffle furnace at 550°C. Carbohydrates calculated by difference. Calcium, iron, and zinc: method described by AOAC.	The values for pitomba were: total energy value – 56.35 kcal, moisture – 83.16 g, protein – 1.15 g, lipids – 0.19 g, carbohydrates – 12.51 g, dietary fiber – 2.40 g, ash – 0.61 g, calcium – 26.7 mg, zinc – 0.84 mg, and iron – 0.60 mg.

134 Table 1. (Continued)

Authors/ Year of publication/ Country	Variables studied	Part of the fruit Analyzed	Model	Methods Used	Results
Marin et al 2009, Brazil.	Calcium, iron, zinc, magnesium, phosphorus, phytic acid, tannin.	Pulp	<i>In Vitro</i>	Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; Colorimetric method and titration; Molar ratio of phytic/mineral acid.	The contents found for pitomba were: Calcium 10.6 mg per 100 g of pulp; Iron 2.4 mg per 100 g of pulp; Zinc 0.5 mg per 100 g of pulp Magnesium 9.8 mg per 100 g of pulp; Phytic acid 1.5 mg phytic acid/100 g pulp and Tannin 38.3 mg quercitannic acid/100 g pulp
Neri-Numa et al 2014, Brazil.	Total content of polyphenols, flavonoids; antiproliferative, antioxidant, and antimutagenic activities.	Whole fruit	<i>In Vitro</i> and <i>In</i> <i>Vivo</i>	DPPH; ABTS; ORAC; HPLC; Folin and Ciocalteu. HPLC	Levels of flavonoid aglycones by HPLC were 89.90 mg/100 g and 30.20 mg/100 g, respectively. Polyphenols and flavonoids were 105.84±20.05 mg GAE/g and 88.05±0.04 mg of CE/g piier extract, respectively. The values for DPPH IC 50, TEAC using ABTS and T-ORAC assays were 9.56±6.75 mg/ml, 115.69±4.23 TE mg/g and 1692.96 mmol TE/100 g, respectively. Antiproliferative activity was observed against UACC-62 (2.6 mg/ml), NCI-ADR / RES (3.1 mg/ml), and OVCAR-3 (3.1 mg/ml). The extract presented anticlastogenic activity.

136 Table 1. (Continued)

137

Authors/ Year of publication/ Country	Variables studied	Part of the fruit Analyzed	Model	Methods Used	Results
Souza et al 2016, Brazil.	Antioxidant activity, phenolic compounds, aroma.	Pulp	<i>In Vitro</i>	DPPH, ABTS, ORAC; LC-MS/MS; GC-MS were used together with headspace solid- phase microextraction.	Using LC-MS/MS, 13 phenolic compounds have been provisionally identified. A total of 27 volatile organic compounds have been identified. Pitomba was observed to have moderate antioxidant activity.

138 TEL: lectin from the seed of *Talisia esculenta*; AOAC: Official Methods of Analysis; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS:
139 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid); ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity; HPLC: High Performance Liquid
140 Chromatography; UACC-62: tumor cell (melanoma); NCI-ADR/RES: tumor cell (breast expressing multiple drug resistance phenotype);
141 OVCAR-3: tumor cell (ovary); LC-MS/MS: liquid chromatography coupled to mass spectrometry; GC-MS: gas chromatography coupled to mass
142 spectrometry.

Physico-Chemical Characteristics

Silva et al [15] and Marin et al [16] evaluated the physico-chemical composition of the pulp of pitomba in their studies.

The variables examined in both works Silva et al.[15] and Marin et al. [16] were: total caloric value TCV (56.35 - 79.1kcal/100 g of pulp), calcium (10.6 - 26.7 mg/100 g of pulp), iron (0.6 - 2,4 mg/100 g of pulp) and zinc (0.5 - 0.84 mg/100 g of pulp).

Both research used fruits from the same Brazilian biome of Cerrado. However, the substantial differences that were observed between the obtained values can be explained by the different conditions of the analyses as well as different harvest times, types of soil, annual precipitation, incidence of UV rays, among other conditions that influence the composition of fruits [18].

Wall [19] evaluated mineral composition of lychee (*Litchia chinensis*), longan (*Dimocarpus longan*), and rambutan (*Nephelium lappaceum*), fruits belonging to the same family as pitomba, and discovered the following values: 6.9 mg/100 g, 4.7 mg/100 g, 7.6 mg/100g for calcium; 0.67 mg/100 g, 0.43 mg/100 g, 0.50 mg/100 g for iron; and 0.23 mg/100 g, 0.16 mg/100 g, 0.26 mg/100 g for zinc, respectively. The values were lower than in the study by Marin et al. [16].

Queiroz et al. [20] examined chemical constituents of lychee fractions in its pulp in g/100 g of dry matter and found contents of 3.80 ± 0.72 for lipid, 6.68 ± 0.59 for protein, 1.82 ± 0.09 for ash, and 85.38 ± 0.89 for carbohydrates. These values were higher than those determined for pitomba by Silva et al. [15] and Marin et al. [16].

Brazilian Food Composition Table [21] provides the following values for umbu (*Spondias tuberosa*) and ambarella (*Spondias dulcis* Parkinson), fruits native to the Brazilian Caatinga biome, respectively: 37 and 46 kcal/100 g for TCV; 0.8 and 1.3 g/100 g for protein;

9.4 and 11.4 g/100 g for carbohydrates; 2 and 2.5 g/100 g for dietary fiber; 11 and 11mg/100 g for magnesium. Among the native Brazilian fruits, these presented the closest values to those of pitomba analyzed by Silva et al. [15].

The difference in composition between the studies is probably due to edaphoclimatic conditions such as seasonality, circadian rhythm, temperature, rainfall index, ultraviolet radiation, altitude, and type of soil as well as time of year when the fruits were harvested. These factors interfere with primary plant metabolism that is responsible for production of compounds responsible for nutritional food value and classified as carbohydrates, proteins, and lipids, among others [22, 23, 18].

Bioactive Compounds and Antioxidant Activity

The bioactive compounds with antioxidant properties present in the foods have been widely studied [24, 25, 26, 27, 28]. These substances are part of the composition of fruits and vegetables and maintain a redox state of a cell, reducing oxidative damage to key structures in the organism, such as lipids, proteins, and DNA, as well as preventing the occurrence of CNCD [29, 30].

Investigating the antioxidant potential of *T. esculenta*, Neri-Numa et al. [13] and Souza et al. [14] used the same 3 methods of analysis: sequestration of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH), a method based on 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS), and the oxygen radical absorption capacity (ORAC). The DPPH and ABTS methods are among the most used techniques for this purpose, the application of more than one method in the same study is crucial to affirm an antioxidant potential of a given product, whether natural and / or obtained from synthetic sources [31]. In spite of the ORAC method that was carried out by the two studies, it is no longer suitable for evaluation of the antioxidant activity due to its association with in vivo

oxidative stress mechanisms and results obtained with this *in vitro* method can not be extrapolated for *in vivo* effects [32].

According to Neri-Numa et al. [13], the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of the *T. esculenta* fruit was significantly higher than kaempferol, gallic acid, myricetin, and quercetin when analyzed by DPPH and ORAC (hydrophilic) methods. It is worth mentioning that according to the ORAC method, the results were about 10 times higher for the *T. esculenta* extract in relation to the standards. The comparisons with the standards were not determined for the ABTS method that returned a result of 115.69 TE $\mu\text{g/g}$ for the pitomba extract. In relation to the total phenolic compounds and the content of flavonols, pitomba demonstrated 105.84 mg GAE/g and 88.05 mg CE/g, respectively. According to the findings of this study, *T. esculenta* is classified as a fruit with an average content of total phenolic compounds, according to a classification proposed by Vasco et al. [33]. The authors also investigated presence of bioactive compounds in the fruit and, with the aid of high efficiency liquid chromatography (HPLC), identified 89.90 mg/100 g and 30.20 mg/100 g of the flavonoid aglycones – quercetin and myricetin, respectively.

Also investigating the antioxidant activity of the *T. esculenta*, Souza et al. [14] analyzed the methanolic pulp extract of the fruit. The ORAC method revealed 78.19 $\mu\text{mol TE/g}$ for the extract (10.95 $\mu\text{mol TE/g}$ for fresh pulp). The DPPH was 7.22 mg GAE/g for the extract (1.0 mg GAE/g for fresh pulp) and the ABTS revealed 12.93 mg GAE/g for the extract (1.8 mg GAE/g for fresh pulp). The authors suggested that pitomba had an antioxidant potential that is superior or similar to various fruits (apple, apricot, banana, kiwi, mango, nectarine, orange, peach, pear, pineapple, and melon) with an exception of blueberry and cranberry [34]. The higher antioxidant potential of red fruits is probably justified by the high content of anthocyanins, a phenolic compound with a pronounced antioxidant action [35], which are practically absent in fruits with similar coloring to pitomba.

Still, in the study of Souza et al. [14], with the aid of chromatography coupled to quadrupole time-of-flight, the authors identified 13 phenolic compounds in the methanolic extract of the pulp of *T. esculenta* that are, in ascending order of retention time: quinic acid, gallic acid, chlorogenic acid, catechin, epicatechin, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, rutin, ferulic acid, quercetin, eriodictyol, acacetina. All of these compounds act as efficient antioxidant agents in different systems [36, 37, 38, 39], corroborating the results found in the *in vitro* antioxidant activity tests for pitomba. Regarding the quantification of phenolic compounds in the methanolic extract, Souza et al. [14] quantified predominantly the quinic acid (507.8 µg/g for dry pulp) followed by coumaric, ferulic, gallic, caffeic, and chlorogenic acids that ranged between 0.6 and 3.4 µg/g for dry pulp. Epicatechin, catechin, and quercetin were also measured with values of 2.9, 1.4, and 0.6 µg/g for dry pulp, respectively. These compounds are found in a wide variety of fruits with recognized antioxidant potential [40, 41, 42].

Souza et al. [14] have also characterized a total of 27 volatile compounds in the pulp of pitomba. The composition of the volatile fraction in fruits is essential for characterization and identification, because they indicate their *flavor* profile, being generally represented by esters, aldehydes, alcohols, terpenes, and their derivatives [43]. Of the total volatile compounds identified in pitomba, the esters: phenethyl acetate (18%), isopentyl acetate (15.11%), and 2-phenylethanol (13%) were predominant, followed by the alcohols, with the 2-phenylethanol as a major compound (13.43%). Moreover, β-ionone (0.72%), linalool (0.84%), and β-bisabolene (0.24%) were also observed, in smaller quantities.

For fruits belonging to the same botanical family as the *Talisia esculenta*, Queiroz et al. [44] evaluated the antioxidant potential of pulp extracts from *Litchi chinensis*. The aqueous extract and the acetone extract showed a percentage of the DPPH radical capture of 41.95% and 27.25 %, respectively.

The different results for the same parameters examined by the 2 studies that evaluated pitomba should probably be attributed to the differences in the implementation of methodologies, such as different harvest times and conditions and different types of the extracts. Furthermore, the secondary metabolites produced by plants may undergo modifications in quantity and quality according to the edaphoclimatic characteristics to which they are exposed, such as rainfall index, solar radiation, temperature, relative air humidity, type of soil, wind, and harvest period [18]. Moreover, the genetic factor should also be considered since the production of secondary metabolites is strictly genetically regulated [45].

Biological Activity: *In Vitro* and *In Vivo* Studies

Preliminary studies on *in vitro* and *in vivo* biological systems are essential for the assessment of the bioactive potential of fruits. Such models assist in elucidation of metabolic pathways that explain the varied biological effects attributed to dietary intake of fruits recognized as potential functional foods. Works in various experimental models demonstrated the activity of fruits as antiproliferative agents in tumor cell lines, antioxidant agents in different biological models, and mitigating agents in inflammatory processes. It is therefore noted that fruits constitute as potential modular components of various processes involved in the genesis of CNCD [46, 47].

Neri-Numa et al. [13] evaluated the antiproliferative activity of the pitomba extract in the lineages of tumor cells U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCI-ADR/RES (breast expressing phenotype multiple drug resistance), 786-0 (kidney), NCI-H460 (lung), PC-3 (prostate), OVCAR-3 (ovary), HT-29 (human colon adenocarcinoma) and VERO (kidney, normal cells of African green monkey). In all of the models the tested concentrations ranged between 0.25, 2.5, 25, and 250 µg/ml. There was an observed increase in the antiproliferative activity directly proportional to the increase of the concentration of the extract in all of the cellular lines, thus, demonstrating a dose-response

effect. The myricetin and quercetin flavonoids, identified in the extract in question, have antiproliferative activity documented in other studies [48, 49, 50, 51], a fact that may help explain the observed results. Moreover, studies conducted on lychee (*Litchi chinensis*), a fruit belonging to the same family as pitomba, also demonstrated an antiproliferative potential. Wen et al. [52] isolated and tested 3 phenolic compounds of lychee leaf (secoisolariciresinol 9'-O- β -D-xyloside; 4,7,7',8',9,9'-hexahydroxy-3,3'-dimethoxy-8,4'-oxy-neolignan; and cinnamtannin B1), and identified cinnamtannin B1 as a potent intracellular antioxidant and antiproliferative agent in HepG2 and Siha cells. Wang et al. [53] evaluated the anticancer effect of the ethanolic extract from the pericarp of lychee in *in vitro* and *in vivo* models for hepatocellular carcinoma and breast cancer. They have verified potential anticancer activity in all of the conducted tests because the extracts led to an inhibition of cellular proliferation, induction of cancer cells apoptosis, and up-regulation and down-regulation of genes involved in regulating cellular cycle, signal translation, transcriptional regulation, mobility, and invasiveness of cancerous cells. Furthermore, the authors indicated ADP-ribosyltransferase (NAD⁺; poly (ADP-ribose) polymerase)-like 1 (ADPRTL1), Cytochrome P450, subfamily I (CYP1A1), and Hyaluronan-mediated motility receptor (HMMR) as key molecular targets for the action of the extract tested. The composition of the pericarp of lychee demonstrates a wide variety of phenolic compounds with recognized antioxidant action [54].

In addition to the *in vitro* proliferative activity, Neri-Numa et al. [13] also evaluated an anticlastogenic activity in animal model, investigating the protective effect of the pitomba extract against clastogenicity induced by cyclophosphamide in rats. The experiment demonstrated that the administration of the *T. esculenta* extract drastically reduced the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MPE), highlighting that all the concentrations tested (30, 100, and 300 mg/kg per body weight) differed significantly from

the control positive (cyclophosphamide), being the highest concentration that presented a more significant protection with a 95.03% reduction of MPE. Studies that evaluate anticlastogenic activity of other fruits of the Sapindaceae family were not found in the literature so far.

In relation to the inflammatory aspect, Freire et al. [17] evaluated the inflammatory potential of the first isolated lectin of the family Sapindaceae, extracted from the seed of pitomba (pitomba seed lectin - PSL) [55, 56]. Plant lectins can mimic the activity of lectins of mammals. For this reason, they have been used in studies that simulate various pathophysiological processes, including proinflammatory mechanisms [17]. Thus, Freire et al. [17] evaluated the effect of PSL on neutrophil migration in mice using the dorsal air pouch, peritoneal cavity, and paw edema models. The concentrations that were used varied between 50 and 2000 $\mu\text{g/ml}$ of PSL in the different experimental models. The authors concluded that the PSL induced neutrophil migration in the different models of cavity and paw edema in mice. However, the authors emphasize that the mechanisms responsible for the observed effects still remain unknown.

The studies selected according to the inclusion criteria for this revision evaluated the pulp and the seed of pitomba separately and the homogenized fruit as a whole, but none evaluated peel of this fruit in isolation. It is important to emphasize that the peel and the seed of pitomba, although not used as food, represent the majority weight percentage of the fruit ($\geq 80\%$ p/p). Yet there is still a lack of information about them, especially about the peel. Studies that assess the use potential of fruit residues are important in promotion of a sustainable production system. Furthermore, the literature has already demonstrated potential usefulness of plant residues [57], including that of other fruits in the Sapindaceae family.

In recent review, Emanuele et al. [58] pointed to lychee being a functional food by gathering studies that demonstrated that the peel of the fruit is the source of flavonoids and

anthocyanins (proanthocyanidin B2, proanthocyanidin B4, and epicatechin, while cyanindin-3-rutinside, cyanidin-3-glucoside, quercetin-3-rutinoside, and quercetin-3-glucoside). Meanwhile, the seed demonstrated a varied content of phenolic compounds with antitumor and cardioprotective action, although it was related to toxicity in the presence of methylene Cyclopropyl-Alanine (MCPA) and methylene cyclopropyl-glycine (MCPG) that are hypoglycemic substances [59, 60].

Conclusion and Perspectives

The fruit of the *Talisia esculenta* species has demonstrated, in its different structures, antioxidant, antiproliferative, antimutagenic, and inflammatory activities so this may possibly be useful in preventing diseases caused by excess free radicals, such as some CNCD. In light of these findings, further studies on its chemical composition and biological effects in vitro and in vivo, since the preliminary results were promising. Moreover, the shortage of research on the composition and biological potential of pitomba has been confirmed, despite it being known and consumed in several regions of Brazil.

Although few studies have been carried out to date, the available information confirms the importance of follow-up research with pitomba. In addition to the potential biological benefits, toxicological tests are essential to indicate whether its consumption is safe. Dissemination of information on little-known fruits, such as the pitomba, can contribute to the local economy in the fruit producing regions, considering the increase in the search for natural foods and their benefits through their regular consumption.

340 Compliance with Ethical Standards

341

342 Conflict of Interest

343 The authors declare that they have no conflicts of interest.

344

345 Funding Agencies

346 Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES)

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

References

1. Lacerda MAD, Lacerda RD, Assis PCDO (2004) A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 4:1-9.
2. Coradin L, Siminski A, Reis A (2011) Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial. In: Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasília, 936 pp.
3. Giulietti AM, Bocage-Neta AL, Castro AAJ et al (2004) Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: Biodiversidade da Caatinga: ações prioritárias para conservação. Recife, 90 pp.
4. OPAS Organização Pan-Americana da Saúde (2016) Modelo de Perfil Nutricional da Organização Pan-Americana da Saúde. Washington, 38 pp.
5. Nascimento KO, Augusta IM, Rodrigues NR et al (2014) Alimentos Minimamente processados: uma tendência de mercado. *Acta Tecnológica* 9:48-61.
7. Guarim-Neto G, Santana SR, da Silva JVB (2003) Botanical repertorium of the pitombeira (*Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk. - Sapindaceae. *Acta Amazonica* 33:237-242.
8. Vieira FA, Gusmão E (2008) Biometry, storage of seeds, and seedling emergence of *Talisia esculenta* Radlk. (Sapindaceae). *Ciência e Agrotecnologia* 32:1073-1079.
9. Santos TC, Júnior JEN, Prata APN (2012) Frutos da Caatinga de Sergipe utilizados na alimentação humana. *Scientia Plena* 8:1-7.

- 381 10. Santos WL, Freire MGM, Bogorni PC et al (2008) Effect of the Aqueous Extracts of the
382 Seeds of *Talisia esculenta* and *Sapindus saponaria* on Fall Armyworm. Braz Archives of
383 Biology and Technology 51:373-383.
- 384 11. Freire M, Vasconcelos IM, Oliveira MV et al (2009) Characterization of a saccharide-
385 binding protein from *Talisia esculenta* seeds with trypsin inhibitory activity. Protein Pept
386 Lett 16:1557-1564.
- 387 12. Freire M, Franco OL, Kubo CE et al (2012) Structural insights regarding an insecticidal
388 *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval
389 control. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular
390 Biology 161:86-92.
- 391 13. Neri-Numa IA, Silva LBC, Ferreira JEM (2014) Preliminary of antioxidant,
392 antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia Esculenta*). LWT - Food
393 Science and Technology 59:1233-1238.
- 394 14. Souza MP, Silva FMA, Almeida RA et al (2016) Phenolic aroma compositions of
395 pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk) assessed by LC-MS/MS and HS-SPME/GC-MS.
396 Food Research International 83:87-94.
- 397 15. Silva MR, Lacerda DBCL, Santos SGG et al (2008) Chemical characterization of native
398 species of fruits from savanna ecosystem. Ciência Rural 38:1790-1793.
- 399 16. Marin AM, Siqueira EM, Arruda SF (2009) Minerals, phytic acid and tannin contents of
400 18 fruits from the Brazilian savanna. International Journal of Food Science Nutrition 60:180-
401 90.

- 402 17. Freire M, Souza IA, Silva AC et al (2003) Inflammatory responses induced in mice by
403 lectin from *Talisia esculenta* seeds. *Toxicon* 42:275-80.
- 404 18. Gobbo NL, Lopes NP (2007) Medicinal plants: factors of influence on the content of
405 secondary metabolites. *Química Nova* 30:374-381.
- 406 19. Wall MM (2006) Ascorbic acid and mineral composition of longan (*Dimocarpus*
407 *longan*), lychee (*Litchi chinensis*) and rambutan (*Nephelium lappaceum*) cultivars grown in
408 Hawaii. *Journal Food Composition and Analysis* 19:655-663.
- 409 20. Queiroz ER, de Abreu CMP, Oliveira KS (2012). Constituintes químicos das frações de
410 lichia in natura e submetidas à secagem: potencial nutricional dos subprodutos. *Revista*
411 *Brasileira de Fruticultura* 34:1174-1179.
- 412 21. Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação (2011) Tabela brasileira de composição
413 dos alimentos - TACO. 4. ed. rev. e ampl. Campinas.
- 414 22. Asai T, Matsukawal T, Kajiyama S (2017) Metabolomic analysis of primary metabolites
415 in citrus leaf during defense responses. *Jounal Bioscience Bioengineering* 123:376-381.
- 416 23. Gouvea DR, Gobbo-Neto L, Sakamoto HT et al (2012) Seasonal variation of the major
417 secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less
418 (Asteraceae: Vernoniaeae) leaves. *Química Nova* 35:2139-2145.
- 419 24. Alu'datt MH, Rababah T, Alhamad MN et al (2017) A review of phenolic compounds
420 in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds.
421 *Food Chemistry* 218:99–106.

- 422 25. Ho CH, Lazim AM, Fazry S et al (2017) Varieties, production, composition and health
423 benefits of vinegars: A review. *Food Chemistry* 221:1621–1630.
- 424 26. González-Aguilar GA, Blancas-Benítez FJ, Sáyago-Ayerdi SG (2017) Polyphenols
425 associated with dietary fibers in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility.
426 *Food Science* 13:84–88.
- 427 27. Pellegrini N, Fogliano N (2017) Cooking, industrial processing and caloric density of
428 foods. *Food Science* 14:98–102.
- 429 28. Atef M, Ojagh SM (2017) Health benefits and food applications of bioactive compounds
430 from fish byproducts: A review. *Journal Functional Foods* 35:673–681.
- 431 29. Martins N, Barros L, Ferreira ICFR (2016) In vivo antioxidant activity of phenolic
432 compounds: Facts and gaps. *Trends Food Science Technology* 48:1-12.
- 433 30. Zimmermann AM, Kirsten VR (2008) Food With antioxidant function in chronic
434 diseases: a clinical approach. *Disc Scientia* 9:51-68.
- 435 31. Alves CQ, David JM, David JP et al (2010) Métodos para determinação de atividade
436 antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova* 33:2202-2210.
- 437 32. USDA (2018) United States Department of Agriculture [https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/oxygen-radical-absorbance-capacity-orac-of-selected-](https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/oxygen-radical-absorbance-capacity-orac-of-selected-foods-release-2-2010/)
438 [foods-release-2-2010/](https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/oxygen-radical-absorbance-capacity-orac-of-selected-foods-release-2-2010/). Accessed in 09 of April of 2018.
- 441 33. Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A (2008) Total phenolic compounds and antioxidant
442 capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* 111:816-823.

- 443 34. Wu X, Beecher GR, Holden JM et al (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant
444 capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
445 52:4026–4037.
- 446 35. Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2:1231–
447 1246.
- 448 36. Grzesik M, Naparło K, Bartosz G et al (2018) Antioxidant properties of catechins:
449 Comparison with other antioxidants. *Food Chemistry* 241:480–492.
- 450 37. Saidani F, Giménez R, Aubert C et al (2017) Phenolic, sugar and acid profiles and the
451 antioxidant composition in the peel and pulp of peach fruits. *Journal Food Composition and*
452 *Analysis* 62:126-133.
- 453 38. Alves ACS, Mainardes RM, Khalil NM (2016) Nanoencapsulation of gallic acid and
454 evaluation of its cytotoxicity and antioxidant activity. *Materials Science and Engineering C*
455 60:126-134.
- 456 39. Liang N, Xue W, Kennepohl P et al (2016) Interactions between major chlorogenic acid
457 isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food*
458 *Chemistry* 213:251–259.
- 459 40. Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V et al (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update
460 of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on
461 polyphenol content. *Database* 1-8.
- 462 41. Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordoñez M et al (2012) Phenol-Explorer 2.0: a major
463 update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and
464 pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database* 1-8.

- 465 42. Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F et al (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive
466 database on polyphenol contents in foods. Database 1-9.
- 467 43. Bicas J, Molina G, Dionísio AP et al (2011) Volatile constituents of exotic fruits from
468 Brazil. Food Reserch International 44:1843–1855.
- 469 44. Queiroz ER, de Abreu CMP, Oliveira KS et al (2015) Bioactive phytochemicals and
470 antioxidant activity in fresh and dried lychee fractions. Revista Ciência Agronômica 46:163-
471 169.
- 472 45. Verma N, Shukla S (2015) Impact of various factors responsible for fluctuation in plant
473 secondary metabolites. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 2:
474 105–113.
- 475 46. Mariani PM, Freitas PDR, Kalil IC et al (2013) Chemopreventive and antimutagenic
476 potential *in vivo* of hydroethanolic fruit extract of *Carica papaya* L. Rev Cubana Plant Med
477 18:381-390.
- 478 47. Gouveia S da S, Lima AA (2017) Insert relationship between reactive species of oxygen
479 and carcinogenic promotion. Braz. J. Surg. Clin. Res 20:174-179.
- 480 48. Klimaszewska-Wisniewska A, Hałas-Wisniewska M, Izdebska M et al (2017)
481 Antiproliferative and antimetastatic action of quercetin on A549 non-small cell lung cancer
482 cells through its effect on the cytoskeleton. Acta Histochemistry 119:99–112.
- 483 49. Sánchez-González PDS, López-Hernández FJ, Dueñas M et al (2017) Differential effect
484 of quercetin on cisplatin-induced toxicity in kidney and tumor tissues. Food and Chemical
485 Toxicology 107:226-236.

- 486 50. Yang C, Lim W, Bazer FW et al (2017) Myricetin suppresses invasion and promotes cell
487 death in human placental choriocarcinoma cells through induction of oxidative stress. *Cancer*
488 *Lett* 399:10-19.
- 489 51. Pan H, Hu Q, Wang, J et al (2016) Myricetin is a novel inhibitor of human inosine 5'-
490 monophosphate dehydrogenase with anti-leukemia activity. *Biochem Biophys Res Commun*
491 477:915-922.
- 492 52. Wen L, You L, Yang X et al (2015) Identification of phenolics in litchi and evaluation of
493 anticâncer cell proliferation activity and intracelular antioxidante activity. *Free Radical*
494 *Biology & Medicine* 84:171–184.
- 495 53. Wang X, Wei Y, Yuan S (2006) Potential anticancer activity of litchi fruit pericarp
496 extract against hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 239:44–150.
- 497 54. Wang HC, Hu ZQ, Wang Y et al (2011) Phenolic compounds and the antioxidant
498 activities in litchi pericarp: Difference among cultivars. *Scientia Horticulturae* 129:784–789.
- 499 55. Freire M, Gomes VM, Corsini RE et al (2002) Isolation and partial characterization of a
500 novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant*
501 *Physiological Biochemistry* 40:61-68.
- 502 56. Freire M, Machado OT, Smolka MB et al (2001) Isolation and characterization of
503 isolectins from *Talisia esculenta* seeds. *Journal Protein Chemistry* 20:495–500.
- 504 57. Hsu CP, Lin CC, Huang CC et al (2012) Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest in
505 Human Colorectal Carcinoma by Litchi Seed Extract. *Journal of Biomedicine and*
506 *Biotechnology* 1-7.

- 507 58. Emanuele S, Lauricella MI, Calvaruso G et al (2017). Litchi chinensis as a Functional
508 Food and a Source of Antitumor Compounds: An Overview and a Description of
509 Biochemical Pathways. *Nutrients* 9:1-15.
- 510 59. Das M, Asthana S, Singh S et al (2015). Litchi fruit contains methylene cyclopropyl-
511 glycine. *Current Science* 109:2195–2197.
- 512 60. Shrivastava A, Kumar A, Thomas, JD et al (2017). Association of acute toxic
513 encephalopathy with litchi consumption in an outbreak in Muzaffarpur, India, 2014: a case-
514 control study. *The Lancet Global Health* 5:458–466.

ARTIGO 2

Caracterização físico-química da polpa e da casca da Pitomba (*Talisia esculenta* (A. St.-Hill.) Radlk) brasileira

(Artigo nas normas da revista Plant Food for Human Nutrition)

Nomes dos autores

Layanne Nascimento Fraga; Anne Karoline de Souza Oliveira, Bruna Pinheiro Aragão; Ana Mara de Oliveira e Silva; Elma Regina Silva de Andrade Wartha; Leandro Bacci; Luciana Pereira Lobato; Izabela Maria Montezano de Carvalho.

Título completo: Compostos bioativos e caracterização físico-química da polpa e da casca da *Talisia esculenta* (A. St.-Hill.) Radlk oriunda do estado de Sergipe/Brasil.

Informações de contato para o autor correspondente

Izabela Maria Montezano de Carvalho.

Endereço: Av. Marechal Rondon, S/n - Jardim Rosa Elze, São Cristóvão - SE, 49100-000.

Telefone/Fax: (79) 31946567.

E-mail: i.montezano.c@gmail.com

Todas as outras afiliações dos autores

Universidade Federal de Sergipe

Endereço: Av. Marechal Rondon, S/n - Jardim Rosa Elze, São Cristóvão - SE, 49100-000.

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a composição físico-química e compostos bioativos de polpa e da casca da pitomba oriunda do estado de Sergipe/Brasil. Foi determinado o rendimento, a caracterização físico-química, o teor de minerais, vitamina C e carotenoides da polpa e casca de pitomba. A casca apresentou elevado rendimento (44,60% do fruto). Notou-se na polpa quantidade considerável de vitamina C ($200,68 \pm 2,93$ mg/100g de amostra fresca) e carotenoides ($43,56 \pm 2,04$ µg/ mL do extrato), enquanto a casca apresentou elevado teor de minerais, principalmente potássio ($223,00 \pm 2,00$ mg/100 g), cálcio ($78,90 \pm 0,40$ mg/100 g) e magnésio ($47,50 \pm 0,90$ mg/100g). O conhecimento dos constituintes da casca e polpa da pitomba, *in natura*, agrega valor ao fruto, pois possibilita um melhor aproveitamento deste, tendo em vista que a casca é descartada e apenas a sua polpa é consumida.

Palavras-chave: *Talisia esculenta*; minerais; carotenoides; vitamina C.

50 Abreviações

51 ATT Acidez total titulável

52 CBAs Compostos Bioativos em Alimentos

53 CE Equivalente em catequina

54 DRI Dietary Reference Intake

55 EEtOHC Extrato Etanólico da casca

56 EEtOHP Extrato Etanólico da polpa

57 EHexC Extrato Hexânico da casca

58 EHexP Extrato Hexânico da polpa

59 SST Sólidos solúveis totais

60 VET Valor energético total

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

Introdução

É crescente o interesse no estudo de frutíferas exóticas que fazem parte da cultura brasileira e que ainda são pouco exploradas cientificamente. As frutas são importantes fontes alimentares de vitaminas, sais minerais, fibras e água, além de fornecerem nutrientes que, quando consumidos regularmente, podem atuar em mecanismos envolvidos na redução de riscos de doenças, como obesidade, diabetes, hipertensão, dislipidemia, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer [1, 2]

Como exemplo destas frutíferas ainda pouco estudadas encontra-se a *Talisia esculenta* (A. St.-Hill.) Radlk, cuja árvore é conhecida popularmente por pitombeira, pertence a família Sapindaceae, cujo fruto é a pitomba. Pode ser encontrado em matas úmidas e secas, tanto no bioma Mata Atlântica, quanto em áreas cobertas pela Caatinga. Assim, seu consumo é predominantemente distribuído nas regiões Norte e Nordeste do Brasil [3, 4, 5].

O período de frutificação se concentra entre os meses de janeiro e abril, dependendo do local de ocorrência. Não existe ainda um cultivo organizado desta espécie, sendo os frutos são coletados em quintais ou em ambientes naturais, e posteriormente utilizados pela população para consumo próprio e/ou comercializados em feiras livres, nas ruas e em supermercados, contribuindo assim para a renda dos pequenos produtores das regiões de origem [3, 4, 6].

O fruto propriamente dito é composto por pouca massa comestível, bastante apreciado pelo sabor característico agri-doce de sua polpa, sendo as demais partes (casca e semente) normalmente descartadas. São poucos os estudos que tratem da composição da polpa deste fruto e nenhum estudo, até então, que avalie a composição da sua casca [3, 4, 7, 8].

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição físico-química, da polpa e da casca da pitomba oriunda do estado de Sergipe/Brasil.

Material e métodos

Coleta do material vegetal e preparação da amostra

Os frutos da pitombeira foram coletados *in loco* na zona rural da cidade Areia Branca-SE (10°45'29" latitude sul e 37°18'45" longitude oeste, altitude de 193,0 metros), na safra 2017, no mês de abril (Bonfim, Costa & Benvenuti, 2002). Os frutos foram transportados para o Laboratório de Técnica e Dietética da Universidade Federal de Sergipe, onde foram higienizados e sanitizados com Hidrosteril®, segundo as instruções do fabricante. A casca e polpa foram separadas manualmente e armazenadas em freezer a -20°C para posteriores análises.

Caracterização físico-química

A determinação de cinzas, umidade, proteínas, carboidratos, sólidos solúveis totais (SST), pH e acidez total titulável (ATT) foram realizadas de acordo com as técnicas da Association of Official Analytical Chemists [11] o teor de lipídios foi analisado segundo metodologia descrita por Bligh e Dyer [12]. O valor energético total (VET) das amostras foi calculado, considerando se os fatores de conversão de Atwater [13].

Determinação de minerais

A determinação de minerais da polpa e da casca *in natura* foi realizada em triplicata por espectrometria de absorção atômica com chama dos referidos minerais em uma amostra representativa do alimento, previamente digerida, seguindo as técnicas do Instituto Adolfo Lutz (2005), foram feitas análises de cálcio, zinco, cobre, ferro, fósforo, magnésio e potássio (método nº 394/IV).

Determinação dos compostos bioativos

Vitamina C

A determinação de vitamina C da casca e polpa da pitomba foi realizada em triplicata por titulometria [15] com solução de ácido oxálico 2% e titulada com solução de 2,6-

diclorofenol-indofenol, previamente padronizada com solução de ácido ascórbico (método nº 967.21).

Carotenoides

A análise de carotenoides foi realizada segundo Lichtenthaler [16], em que 2 g de amostra fresca foram homogeneizados com 0,2 g de carbonato de cálcio e 7 mL de acetona 80%, em seguida, a mistura foi filtrada em papel filtro (Unifil diâmetro de 9 cm) diretamente em balão volumétrico âmbar e completado para 25 mL com acetona 80%. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro, em triplicata, a 647, 663 e 470 nm e a concentração foi estimada conforme a equação:

$$\text{Carotenóides} = \{1000 \times A_{470} - (1,82 \times Ca - 104,96 \times Cb)\} / 198$$

A concentração de pigmentos obtidos inserindo os valores de absorvância foi expressa em µg/mL do extrato da polpa e casca.

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Para análise estatística dos dados, foram utilizados a Anova pós teste de Tukey (p<0,05) (para analisar a proporção do fruto inteiro e suas frações, flavonoides totais e fenólicos totais) e o Teste T student (p<0,05) (para análise da diferença da composição centesimal, minerais, vitamina C e carotenoides da casca e polpa) usando-se o software Graphpad Prism (6.0).

Resultados e discussão

Caracterização físico-química

A tabela 1 mostra o rendimento em gramas e em percentual, do fruto inteiro das partes que o compõem.

Tabela 1. Proporção de frutos inteiros de Pitomba (*Talisia esculenta* Radlk) e de suas frações.

Frações	Massa (g)	Proporção %
Fruto inteiro	6,30±0,94	100
Casca	2,81±0,14 ^a	44,60
Polpa	0,97±0,08 ^b	15,40
Semente	2,52±0,82 ^a	40

* Resultados expressos em média (n= 3) ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A polpa da pitomba apresenta baixo rendimento quando comparada à casca e à semente. Queiroz et al [19] estudaram a lichia (*Litchi chinensis* Sonn), fruto pertencente à mesma família botânica da pitomba, e encontraram peso médio de 18,39±0,44g, dos quais 4,98±0,21g (27,07%) eram cascas, 4,05±0,18g (22,02%) eram sementes e 9,36±0,24g (50,89%) eram polpa. Queiroz et al[20] também avaliaram a lichia, e verificaram peso médio de 16,36±0,25g, e as proporções das frações se mantiveram semelhantes em ambos os estudos, diferentemente do rendimento da pitomba em que a polpa representa a menor fração do fruto (15,40%).

Na Tabela 2 estão descritas as características físico-químicas da parte comestível da pitomba, isto é, a polpa.

Tabela 2. Características físico-químicas da polpa da pitomba (*Talisia esculenta* Radlk).

Parâmetros físico-químicos	Polpa
pH	4,20±0,04
Sólidos solúveis Totais-SST (°Brix)	21,33±0,25
Acidez titulável -ATT(g ác.cítrico/100g)	0,25±0,00
Razão (SST/ATT)	85,32

* Resultados expressos em média (n= 3) ± desvio padrão.

A polpa da pitomba apresentou elevada a razão SST/ATT, o que permite supor que os frutos analisados apresentavam avançado estágio de maturação, visto que, durante este processo, o teor de ácidos orgânicos na maioria dos frutos decai, pois estes são utilizados no processo respiratório, levando ao aumento da concentração de açúcares simples até o completo amadurecimento [21, 22].

Esses dados são importantes para identificar o estágio de maturação do fruto, bem como, os seus padrões de identidade e qualidade, fornecendo informações de interesse para indústria alimentícia. Frutos maduros apresentam sabor, cor e aroma mais pronunciado, podendo-se reduzir, portanto, a adição de açúcares e conservantes aos produtos [21, 22].

Andrade et al [23] analisaram diferentes genótipos de fruto de rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), fruto já comercializado, também pertencente à família Sapindaceae, e o teor de SST encontrado pelos autores variou de 7,93 a 19,5 ° Brix e a ATT variou de 0,33 a 2,04 mg/100mL.

Os resultados para composição centesimal e valor energético total (VET) para a casca e polpa de pitomba estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição centesimal (g/100g) da casca e polpa da pitomba (*Talisia esculenta* Radlk).

Parâmetros	Polpa	Casca
Umidade (g/100g)	80,58±0,10 ^a	58,42±0,64 ^b
Proteínas (g/100g)	2,15±0,08 ^a	2,68±0,16 ^a
Lipídios (g/100g)	0,7±0,01 ^a	0,1±0,02 ^b
Cinzas (g/100g)	0,7±0,04 ^a	1,63±0,10 ^b
Carboidratos totais (g/100g)	15,85±0,12 ^a	37,15±0,82 ^b
VET (Kcal)	78,30±0,31 ^a	160,24±2,86 ^b

* Resultados expressos em média (n= 3) ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo Teste de T student (p<0,05).

Os teores de umidade, lipídios, cinzas, carboidratos da polpa e casca diferiram significativamente entre si (p<0,05) e o percentual de proteínas foi semelhante entre as frações não diferindo estatisticamente (p>0,05).

A composição da polpa, neste trabalho, assemelha-se à obtida por Silva et al [25], que analisaram somente a polpa de pitomba, e encontraram teores de umidade, proteínas, lipídeos, carboidratos e cinzas de 83,16 ± 0,73 g/ 100g; 1,15 ± 0,02 g 100g; 0,19 ± 0,01 g 100g; 12,51 ± 0,69 g 100g; 0,61 ± 0,01g 100g de polpa de pitomba respectivamente. Marin et al [26] analisaram a polpa de pitomba, e esta apresentou valor calórico total de 79,1 kcal (g/100g de

polpa) e percentual de umidade de $78,1 \pm 1,1$, valores estes que se aproximam ao da polpa do presente estudo.

Os dados da composição da casca de pitomba assemelham-se aos obtidos por Queiroz et al [19], que analisaram o teor de lipídios, proteínas, cinzas e carboidratos e VET na casca da lichia, encontrando $6,97 \pm 0,65$ g/100g; $10,86 \pm 0,26$ g/100g; $2,17 \pm 0,11$ g/100g; $61,11 \pm 1,25$ g/100g; $107,66 \pm 4,26$ kcal/100g, respectivamente.

A Tabela 4 apresenta os teores de minerais (fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, zinco e ferro) da polpa e casca de pitomba.

Tabela 4. Teores de minerais (mg/100g) da casca e polpa da pitomba (*Talisia esculenta*).

Minerais	Polpa	Casca	Valores de referência (mg)**
Fósforo (P)	$17,90 \pm 0,50^a$	$32,30 \pm 0,10^b$	700
Potássio (K)	$91,90 \pm 1,40^a$	$223,00 \pm 2,00^b$	4700
Cálcio (Ca)	$23,00 \pm 0,52^a$	$78,90 \pm 0,40^b$	1000
Magnésio (Mg)	$16,30 \pm 0,15^a$	$47,50 \pm 0,90^b$	320-420
Cobre (Cu)	$0,10 \pm 0,00^a$	$0,44 \pm 0,03^b$	0,9
Zinco (Zn)	$0,08 \pm 0,01^a$	$1,21 \pm 0,12^b$	8-11
Ferro (Fe)	$1,55 \pm 0,06^a$	$2,39 \pm 0,04^b$	8-18

* Resultados expressos em média ($n = 2$) \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo Teste de T student ($p < 0,05$). **Valores de referência de acordo com as DRIs (Dietary Reference Intake) [27].

Os minerais mais abundantes nestas frações foram o potássio; cálcio e magnésio, sendo todos os valores encontrados significativamente ($p > 0,05$) superiores na casca em relação à polpa.

O consumo de 100 g de polpa de pitomba corresponde a aproximadamente 1,95%; 5,9 % e 2,3 % da ingestão diária recomendada de acordo com as DRIs para um indivíduo adulto dos minerais potássio, magnésio e cálcio, respectivamente [27]. Enquanto 100g de casca, corresponde a 4,75 %, 14,84%, 7,89%, da ingestão diária recomendada para os mesmo nutrientes, respectivamente.

Silva et al [25], analisando o teor de minerais da polpa de pitomba, encontraram o teor de cálcio de $26,7 \pm 6,35$ mg/100g, semelhante à polpa do presente estudo (23 mg/100g).

Wall [28] analisou o teor de minerais do rambutan de três diferentes regiões. O teor de potássio variou de 134,5 a 249,4 mg/100g; cálcio de 6,8 a 8,7 mg/100g e magnésio de 13,3 a 17,2 mg/100g.

Ressalta-se que essas informações agregam valor ao fruto, uma vez que a composição da sua casca até então era desconhecida e esta tem potencial nutritivo que futuramente pode ser explorado e utilizada na elaboração de novos produtos. A ingestão destes nutrientes em quantidades adequadas é importante para o bom funcionamento do organismo, e as frutas estão entre as principais fontes destes minerais. Dentre outras funções, estes nutrientes atuam no transporte de substâncias, no sistema imunológico, como cofatores enzimáticos como é o caso do cobre, zinco e magnésio, outros na contração muscular, coagulação sanguínea, formação óssea e manutenção do potencial elétrico, como cálcio e potássio [29, 30, 31, 32].

Carotenoides totais e vitamina C

Em relação aos teores de carotenoides totais e vitamina C (Tabela 5), os valores encontrados na polpa de pitomba foi significativamente superior ao da casca ($p < 0,05$).

Tabela 5. Teor de vitamina C e carotenoides totais da casca e polpa da *Talisia esculenta*.

Compostos	Polpa	Casca
Vitamina C (mg/100g de amostra) **	200,68 \pm 2,93 ^a	128,34 \pm 5,84 ^b
Carotenoides totais (μ g/mL do extrato) **	343,56 \pm 2,04 ^a	116,64 \pm 3,19 ^b

** Resultados expressos em média (n= 3) \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo Teste de T student ($p < 0,05$).

Sousa et al [33] para polpa e casca da lichia e verificaram teores de vitamina C de 24,63 \pm 0,70 mg/100g e 0,92 \pm 0,07 mg/100g, respectivamente. Andrade et al [23] analisaram o teor de vitamina C do rambutan de diferentes genótipos, os valores obtidos variaram de 28,61 a 156,06 mg/100mL.

Dentre os frutos já conhecidos por serem fontes tradicionais de vitamina C estão a laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e a acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). Segundo a Tabela

Brasileira de composição dos alimentos [34], o teor de vitamina C para laranja é de 53,7 mg/100g (parte comestível) e da acerola é de 941,4 mg/100g (parte comestível).

De acordo com as DRIs a necessidade diária de Vitamina C para um adulto, corresponde a 75 mg/dia [27], e dessa forma, aproximadamente 37,37 mg de polpa de pitomba fornecem a quantidade diária necessária de vitamina C segundo as DRIs para este nutriente.

De acordo com Rodrigues-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan [35], a polpa do buriti contém elevada quantidade destes compostos. Manhaes e Sabaa-Srur [36] no seu estudo avaliaram a polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*), e a quantidade de carotenoides totais foi de $23,36 \pm 0.98$ mg/100g.

A vitamina C e os carotenoides estão atrelados a diminuição do risco de diversas doenças. Dentre outras funções o primeiro atua na síntese de colágeno e melhora do sistema imunológico, o segundo atua na prevenção da ocorrência de catarata e como corantes naturais de interesse para indústria de alimentos. Destaca-se que ambos os compostos agem como antioxidantes naturais, e têm a capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, protegendo assim as células de danos oxidativos [37, 38].

Vale ressaltar que as diferenças entre os resultados encontrados no presente estudo e os trabalhos buscados na literatura podem ser decorrentes de vários fatores, entre estes, deve-se considerar que tais características variam entre as diferentes espécies dos frutos, de acordo com o cultivar, condições climáticas e região de cultivo, bem como, por terem sido aplicadas diferentes metodologias nos estudos em questão, para uma mesma análise [23, 24, 39, 40, 41].

Conclusão e perspectivas

A polpa e casca da pitomba representam fonte expressiva de vitamina C e carotenoides, sendo a polpa de maior destaque para esses nutrientes. A casca apresentou

elevado teor de minerais como potássio, cálcio e magnésio. Dados sobre a composição deste fruto são cruciais, uma vez que informações sobre a constituição química de alimentos exóticos nativos brasileiros são limitadas. Desta forma, o conhecimento dos constituintes da casca e polpa da pitomba, *in natura*, agrega valor ao fruto, pois possibilita melhor aproveitamento deste, tendo em vista que a casca é descartada e apenas a sua polpa é consumida. Não obstante é necessária a realização de novos estudos que relatem seus fatores antinutricionais, potencial toxicidade e propriedades biológicas.

291	Conformidade com os Padrões Éticos
292	Os autores declaram conformidade com os padrões éticos.
293	Conflito de interesses
294	Os autores declaram não ter conflitos de interesse.
295	Agência de financiamento
296	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
297	
298	
299	
300	
301	
302	
303	
304	
305	
306	
307	
308	
309	
310	
311	
312	
313	
314	
315	

Referências

1. Brasil (2016) Ministério da Saúde. Na cozinha com as frutas, legumes e verduras. Brasília, DF.
2. Coradin L, Siminski A, Reis A (2011) Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial. Brasília, 936 pp.
3. Santos TC, Júnior JEN, Prata APN (2012) Frutos da Caatinga de Sergipe utilizados na alimentação humana. Scientia Plena 8:1-7.
4. Giuliatti AM, Bocage-Neta AL, Castro AAJ et al (2004) Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: Biodiversidade da Caatinga: ações prioritárias para conservação. Recife, 90 pp.
5. Brasil (2018) Ministério do meio ambiente. Biodiversidade. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade>. Acessado em 04 de fevereiro de 2018.
6. Alves EU, Silva B, Gonçalves EP et al (2009) Germinação e vigor de sementes de *Talisia esculenta* (St. Hil) Radlk em função de diferentes períodos de fermentação. Semina: Ciências Agrárias 30:761-770.
7. Neri-Numa IA, Silva LBC, Ferreira JEM (2014) Preliminary of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia Esculenta*). LWT - Food Science and Technology 59:1233-12
8. Freire M, Souza IA, Silva AC et al (2003) Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. Toxicon 42:275-80.
9. Bonfim LFC, Costa IVG, Benvenuti SNP (2002) Projeto Cadastro da Infra-Estrutura Hídrica do Nordeste: Estado de Sergipe. Diagnóstico do Município de Areia Branca. Aracaju: CPRM.

- 339 10. Navarro DDF (2005) Estudo químico biológico e farmacológico das espécies *Allamanda*
340 *Blanchetti Allamanda Schotti* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico.
341 (Tese). Universidade Federal de Santa Catarina, 293 p.
- 342 11. AOAC-Association of Official Analytical Chemists (1995) Official Methods of Analysis
343 of AOAC. Washington, cap. 37:4-7.
- 344 12. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can.
345 J. Biochem. Physiol 37:911-917.
- 346 13. Merrill AL, Watt BK (1973) Energy value of foods: basis and derivation. Washington,
347 DC: USDA.
- 348 14. Instituto Adolfo Lutz-IAL. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos
349 químicos e físicos para análises de alimentos. 4 ed. Brasília, 1018p.
- 350 15. AOAC - Association of Official Analytical Chemists (1998) Peer-verified methods
351 program. Manual on policies and procedures. Gaithersburg, 35p.
- 352 16. Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic
353 biomembranes. In: PACKER, L., DOUCE, R. (Eds.) Methods in Enzymology. London:
354 Academic Press 148:350-81.
- 355 17. Swain T, Hills WE (1959) The phenolic constituents of *Punus domestica*. I. Quantitative
356 analysis of phenolic constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture 19:63-68.
- 357 18. Jia Z, Tang M, Wu J (1999) The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and
358 Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. Food Chemistry 64:555-559.
- 359 19. Queiroz ER, de Abreu CMP, Oliveira KS (2012) Constituintes químicos das frações de
360 lichia in natura e submetidas à secagem: potencial nutricional dos subprodutos. Revista
361 Brasileira de Fruticultura 34:1174-1179.

- 362 20. Queiroz ER, de Abreu CMP, Oliveira KS et al (2015) Bioactive phytochemicals and
363 antioxidant activity in fresh and dried lychee fractions. *Revista Ciência Agronômica* 46:163-
364 169.
- 365 21. Chitarra MIF, Chitarra AB (2005) Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e
366 manuseio. 2. Ed. 783 pp.
- 367 22. Gobbo NL, Lopes NP (2007) Medicinal plants: factors of influence on the content of
368 secondary metabolites. *Química Nova* 30:374-381.
- 369 23. Andrade RA (2008) Caracterização morfológica e química de frutos de rambutan. *Rev.*
370 *Bras. Frutic., Jaboticabal* 30:958-963.
- 371 24. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Portaria nº 58, de 30 de agosto de
372 2016.
- 373 25. Silva MR, Lacerda DBCL, Santos SGG et al (2008) Chemical characterization of native
374 species of fruits from savanna ecosystem. *Ciência Rural* 38:1790-1793.
- 375 26. Marin AM, Siqueira EM, Arruda SF (2009) Minerals, phytic acid and tannin contents of
376 18 fruits from the Brazilian savanna. *International Journal of Food Science Nutrition* 60:180-
377 90.
- 378 27. Institute of medicine (2000) Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E,elenium,
379 and carotenoids. Washington (DC): National Academy Press.
- 380 28. Wall MM (2006) Ascorbic acid and mineral composition of longan (*Dimocarpus longan*),
381 lychee (*Litchi chinensis*) and rambutan (*Nephelium lappaceum*) cultivars grown in Hawaii.
382 *Journal Food Composition and Analysis* 19:655-663.
- 383 29. Martins EM, Jodas G, Voltera AF et al (2014) Efeito do exercício e suplementação de
384 potássio sobre a PA, metabolismo glicídico e albuminúria de ratos hipertensos. *Jornal*
385 *Brasileiro de Nefrologia* 36:271-279.

- 386 30. Macedo EMC, Amorim MAF, Silva ACS et al (2010) Efeitos da deficiência de cobre,
387 zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. Revista Paulista
388 de Pediatria 28:329-340.
- 389 31. Pereira GAP, Genaro PS, Pinheiro MM et al (2009) Cálcio dietético – estratégias para
390 otimizar o consumo. Revista Brasileira de Reumatologia 49:164-80.
- 391 32. Christmann V, Kornmann MN, Roeleveld N et al (2016) Changes in Biochemical
392 Parameters of the CalciumPhosphorus Homeostasis in Relation to Nutritional Intake in Very-
393 Low-Birth-Weight Infants. Nutrients 8:1-12.
- 394 33. Sousa PB, Silva EF, Lima MA (2012) Avaliação físico-química de lichias (*Litchi*
395 *chinensis* Sonn.) comercializadas em Teresina-Piauí. VI Connepi.
- 396 34. Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação (2011) Tabela brasileira de composição
397 dos alimentos - TACO. 4. ed. rev. e ampl. Campinas.
- 398 35. Mesquita SS, Teixeira CMLL, Servulo EFC (2017) Carotenoides: Propriedades,
399 Aplicações e Mercado. Revista Virtual de Química 9:1-17.
- 400 36. Lordêlo MCS, Costa RS, Santana AS et al (2010) Compostos fenólicos, carotenóides e
401 atividade antioxidante em produtos vegetais. Ciências Agrárias, Londrina 31:669-682.
- 402 37. Rodrigues-Amaya DB, Kimura M, Amaya-Farfan J (2008) Fontes brasileiras de
403 carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília:
404 MMA/SBF.
- 405 38. Manhaes LRT, Sabaa-Srur AUO (2011) Centesimal composition and bioactive
406 compounds in fruits of buriti collected in Pará. Ciência e Tecnologia de Alimentos 31:856-
407 863.
- 408 39. Couto MAL, Canniatti-Brazaca AG (2010) Quantificação de vitamina C e capacidade
409 antioxidante de variedades cítricas. Ciência e Tecnologia de Alimentos 30:15-19.

- 410 40. Galani JHY, Patel JS, Patel JN et al (2017) Storage of Fruits and Vegetables in
411 Refrigerator Increases their Phenolic Acids but Decreases the Total Phenolics, Anthocyanins
412 and Vitamin C with Subsequent Loss of their Antioxidant Capacity. *Antioxidants* 6:1-22.
- 413 41. Denardin CC Hirsch EG, Rocha RF et al (2015) Antioxidant capacity and bioactive
414 compounds of four Brazilian native fruits. *Journal of food and drug analysis* 1-12.

ARTIGO 3

Perfil químico por espectrometria de massas - ESI-FT-MS, atividade antioxidante e citotoxicidade da casca e da polpa de *Talisia esculenta* (St. Hil.) Raldk.

(Artigo nas normas da revista Food Research International)

Perfil químico por espectrometria de massas - ESI-FT-MS, atividade antioxidante e citotoxicidade da casca e da polpa de *Talisia esculenta* (St. Hil.) Raldk.

Layanne Nascimento Fraga^a, Anne Karoline de Souza Oliveira^b, Bruna Pinheiro Aragão^a, Edmilson Willian Propheta dos Santos^c, Josué Alves Melo^d, Ana Mara de Oliveira e Silva^e, Elma Regina Silva de Andrade Wartha^e Alberto Wisniewski Junior^f, Cristiane Bani Corrêa^g, , Leandro Bacci^h, Izabela Maria Montezano de Carvalho^e.

^aMestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição-Universidade Federal de Sergipe (UFS).

^bDoutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde-UFS.

^cGraduando em Ciências Biológicas-UFS.

^dDoutorando do Programa de Pós-graduação em Química-UFS.

^eDocente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição-UFS.

^fDocente do Departamento de Química – UFS.

^gDocente do Departamento de Morfologia- UFS.

^hDocente do Departamento de Engenharia Agrônômica- UFS.

Informações de contato para o autor correspondente

Izabela Maria Montezano de Carvalho.

Endereço: Av. Marechal Rondon, S/n - Jardim Rosa Elze, São Cristóvão - SE, 49100-000.

Telefone/Fax: (79) 31946567.

E-mail: i.montezano.c@gmail.com

Resumo

O objetivo do presente estudo foi determinar o perfil químico por espectrometria de massas ESI-FT-MS, atividade antioxidante *in vitro* por diferentes métodos e a citotoxicidade da casca e polpa da pitomba. O extrato etanólico da casca (EEtOHC) apresentou elevado percentual de varredura do radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl -DPPH• (54,21 a 81,41 %) e 2,2-Azino-Bis-(Ácido 3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfônico- ABTS• (78,16 a 94,07%), em relação aos demais ($p < 0,05$). Os extratos EEtOHC, hexânicos da casca (EHexC), etanólico da polpa (EEtOHP) e hexânico da polpa (EHexP) apresentaram atividade semelhante para os métodos de redução do óxido nítrico-NO e de lipoperoxidação espontânea-TBARs. Foram identificados rutina e ácido cítrico nos EEtOHC e EEtOHP, respectivamente, por meio da ESI- FT-MS. Vê-se a casca e polpa da pitomba como promissoras fontes de compostos naturais com atividade antioxidante, sendo necessária a realização de estudos *in vivo* para avaliação de seus possíveis benefícios e efeitos adversos em distintos modelos biológicos.

Palavras-chave: perfil antioxidante, compostos bioativos, *Talisia esculenta*, pitomba, ESI- FT-MS, citotoxicidade.

1. Introdução

O Brasil é um país reconhecido por sua variedade de frutas nativas, sendo estas excelentes fontes de vitaminas, minerais, fibras e substâncias que, além de nutrir, podem trazer benefícios adicionais à saúde quando consumidos regularmente como parte da alimentação (Liu, 2013; Virgolin et al., 2017; Barba, 2017).

Dentre as frutas nativas está a *Talisia esculenta* (St. Hil.) Raldk, pertencente à família *Sapindaceae*, seu fruto é popularmente conhecido como pitomba. É de ocorrência natural nas regiões Norte e Nordeste do país. A polpa dos frutos é consumida *in natura* e apreciada por seu sabor característico agridoce. Os frutos são comercializados em feiras livres, barracas de rua e em supermercados locais (Giullietti et al., 2004; Santos, Junior & Prata, 2012).

São escassos os estudos que tratem da composição fitoquímica da pitomba, especialmente da sua casca, a qual permanece desconhecida até o momento. Alguns autores apontam o fruto como promissora fonte de compostos antioxidantes ao analisar sua polpa. Neri-Numa et al. (2014) identificaram os flavonoides miricetina e quercetina e Souza et al. (2016) identificaram compostos aromáticos, como o acetato de fenetila, o isopentilo e o 2-fenil-etanol.

Vale ressaltar que outros frutos pertencentes à família *Sapindaceae*, como a lichia (*Litchi chinensis* Sonn) e o guaraná (*Paullinia cuppana*) contém teor considerável de compostos bioativos (CBAs) (Santos, Junior & Prata, 2012; Jiang et al., 2013; Queiroz et al., 2015; Alves et al., 2017).

Estudos atribuem ao consumo habitual de alimentos que são fontes de CBAs à redução do risco da ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (Haminiuk et al., 2012; González et al., 2017; Pires et al., 2018). Alguns dos CBAs conhecidos são os compostos fenólicos, carotenoides, ácido ascórbico e tocoferóis, os quais demonstram

pronunciada capacidade antioxidante, antitumoral, antiinflamatória e antiproliferativa (Halliwell, 2007; Liu, 2013; Virgolin et al., 2017; Barba, 2017; Carocho et al., 2018).

Diante do exposto o objetivo deste estudo foi determinar o perfil químico por espectrometria de massas ESI-FT-MS, atividade antioxidante *in vitro* por diferentes métodos e a citotoxicidade da casca e polpa da pitomba.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes utilizados

Álcool metílico (Êxodo científica P.A-ACS-99,8%); Álcool etílico (Alphapac P.A 99,8%); Clorofórmio (Synth PA A.C.S-99,8%); Acetona (Êxodo Científica P.A-A.C.S-99,5%), Hexano (NEON-P.A-99,8%); Folin Ciocalteu (Dinâmica P.A-CAS); Carbonato de sódio Anidro (Vetec P.A-99,5%); Ácido gálico (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S 99%); 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ((DPPH) Sigma-Aldrich P.A-98%); 2,2-Azino-Bis-(Ácido 3 – Etilbenzotiazolina-6-Sulfônico((ABTS) Sigma –Aldrich-98%); Persulfato de potássio (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S-99%); Nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S-99%); Ácido acético (Synth P.A-A.C.S.ISO-99,5%); ácido fosfórico (Synth P.A-A.C.S-85%); Sulfato de ferro II heptahidratado (NEON P.A-99%); 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine ((TPTZ) Sigma-Aldrich P.A-99%); Cloreto férrico (Dinâmica P.A-A.C.S-97%); Ácido tiobarbitúrico ((TBA) MPbiomedicals, LLC); 1,1,3,3-tetraetoxiopropano ((TEP)- Sigma-Aldrich P.A-96%); Cloreto de alumínio (Sigma-Aldrich Reagent Plus-99%); Nitrito de sódio (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S-99%); β -caroteno (Fluka P.A-97%); Ácido linoleico (Sigma P.A-99%); Tween 20 (Sigma-Aldrich P.A-99%); Ácido nítrico (Synth P.A-A.C.S-70%); Sulfalinamina (Sigma P.A-99%); N-diclororidrato de (1-naftil) etilenodiamina (Sigma-Aldrich P.A-A.C.S-98%); Catequina (Sigma P.A.-99%; 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid ((Trolox) Sigma- Aldrich P.A-97%).

2.2. Coleta do material vegetal

Os frutos da pitombeira foram coletados *in loco* na zona rural da cidade Areia Branca-SE (10°45'29" latitude sul e 37°18'45" longitude oeste, altitude de 193,0 metros), na safra 2017, no mês de abril (Bonfim, Costa & Benvenuti, 2002). Os frutos foram transportados para o Laboratório de Técnica e Dietética da Universidade Federal de Sergipe, onde foram higienizados e sanitizados com Hidrosteril®, segundo as instruções do fabricante. A casca e polpa foram separadas manualmente e armazenadas em freezer a -20°C para posteriores análises.

2.3. Preparo dos extratos

Os extratos foram obtidos por percolação exaustiva de forma sequencial utilizando dois solventes: hexano (extrato hexânico da casca – EHexC, e extrato hexânico da polpa – EHexP) e etanol (extrato etanólico da casca – EEtOHC, e extrato etanólico da polpa – EEtOHP). Para tanto, 50 gramas de casca e 50 gramas de polpa foram liofilizados e colocados em percoladores com 200 mL de hexano por 48 horas, após esse período foram rotaevaporados (Rotaevaporador Fisatom-801) e concentrados em concentrador de extratos à vácuo (Concentrador de amostras a vácuo - RVC 2-33), posteriormente, à mesma amostra foram adicionados 200 mL de etanol que também permaneceu por 48 horas no percolador e após esse período foram rotaevaporados e concentrados (NAVARRO, 2005).

2.4 Determinação dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais

2.4.1. Compostos fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações, seguindo o procedimento descrito por Swain & Hills (1959). Foram transferidos 12,5 µL de cada extrato em triplicata (EEtOH da polpa e casca e EHex da polpa e

casca) para microplaca e adicionadas 200 µL de água destilada e 12,5 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. A solução foi homogeneizada em vortex mixer, e após 3 minutos da reação foram acrescidos 25 µL de solução saturada de carbonato de sódio, novamente homogeneizando a solução. Após 1 hora de repouso, foram realizadas as leituras de absorbância em leitor de placas a 720 nm. O ácido gálico foi utilizado para a curva padrão (12,5 a 200 µg) e os resultados, expressos em equivalentes de ácido gálico.

2.4.2. Flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi quantificado por Jia, Tang, & Wu (1999), com adaptações para microplacas. Na microplaca foram pipetados em triplicata 25µL de cada extrato (EetOH da polpa e casca e EHex da polpa e casca) e adicionados 100µL de água destilada e 7,5µL de NaNO₂ (5%), após 6 minutos, foram pipetados 7,5µL AlCl (10%), após 6 minutos, foram pipetados 100 µL de NaOH (4%) e 10µL de água destilada. Aguardou-se 15 minutos e foi realizada a leitura da absorbância a 510 nm em leitor de placas. Para controle negativo utilizou-se água destilada em substituição da amostra. Os resultados foram expressos em equivalentes de catequina (12,5-200µL/mL).

2.5. Determinação da atividade antioxidante

2.5.1. Varredura do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio do radical DPPH• conforme método empregado por Blois (1958) e Brand-Willians et al. (1995) com modificações. Alíquotas de 50 µL de cada extrato, em diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL) foram transferidas para microplacas e foram adicionados 150 µL de solução metanólica de DPPH• a 6×10^{-5} mol/L. A redução do radical DPPH• foi medida a 515 nm em leitor de placas, logo após 30 minutos de repouso. O percentual de varredura do radical DPPH• foi expresso pela equação:

$$\% \text{ de varredura} = [(Ab_{\text{Scontrole}} - Ab_{\text{Samostra}}) / Ab_{\text{Scontrole}}] \times 100$$

2.5.2. Captura do radical ABTS•

Em microplaca, 30µL da amostra em diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL) foram adicionados a 300µL do radical ABTS• (que corresponde a 5 mL da solução estoque de ABTS a 7mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio a 140 mM). As leituras de absorbância foram realizadas no tempo de 0, 6 e 15 minutos em leitor de placas a 734 nm (Re et al., 1999). Os resultados foram expressos como percentagem de varredura do radical ABTS• pela equação:

$$\% \text{ de varredura} = [(Ab_{\text{Scontrole}} - Ab_{\text{Samostra}}) / Ab_{\text{Scontrole}}] \times 100$$

2.5.3. Capacidade Redutora do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada conforme Oyaizu (1986) com algumas modificações. Alíquotas de 9 µL de cada extrato em diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 15e 20 mg/mL) foram pipetadas em microplaca (CralPlast-96 poços), na qual foram acrescentados 27µL de água destilada e 270µL do reagente FRAP que foi preparado apenas no momento da análise (o reagente é composto pela mistura: 25 mL de tampão acetato 0,3 M; 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). A placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos e a leitura foi realizada a 595 nm em leitor de placas. O sulfato ferroso (FeSO₄) foi utilizado como padrão e os resultados, expressos em µM de equivalentes de sulfato ferroso produzido (Singhal, Paul, & Singh, 2014).

2.5.4. Sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante dos extratos EHex e EEtOH obtidos da polpa e casca de pitomba foi mensurada de acordo com o método descrito por Miller (1971) com modificações. Para o meio de reação foram colocados em béquer 200µL de solução de β-

caroteno (2mg/mL) + 10µL de ácido linoleico + 50 µL de Tween 20 + 500µL de clorofórmio, após a evaporação do clorofórmio em capela, adicionou-se a essa mistura 25 mL de água destilada saturada em O₂ após evaporação do clorofórmio. Deste meio de reação alíquotas de 250µL foram transferidas para microplacas (CralPlast-96 poços) contendo as amostras em diferentes concentrações (0,5; 1; 2,5; 5; 10 mg/mL).

Os valores da densidade ótica foram obtidos no tempo zero e 120 minutos depois, enquanto as amostras foram mantidas em banho-maria a 50°C, em leitor de placas. Os resultados foram expressos em percentual de proteção da oxidação. O decaimento da densidade ótica do controle ($Abs_{inicial} - Abs_{final}$) foi considerado como 100 % de oxidação. O percentual de proteção da oxidação das amostras foi estabelecido pela equação:

$$\% \text{ de proteção da oxidação} = 100 - [(Abs_{amostra} \times 100) / Abs_{controle}]$$

2.5.5. Peroxidação espontânea em homogenato de cérebro de rato

Neste ensaio foi empregado cérebro de rato *Wistar* macho de um estudo anterior com a pitaya e mangaba, sob responsabilidade da professora Dr^a Elma Regina de Andrade Wartha, previamente avaliado e aprovado pela Comissão de Experimentação em Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (Protocolo 07/2017-Anexo1). O animal foi anestesiado e após decapitação, o cérebro foi imediatamente lavado com NaCl 0,9% frio e homogeneizado na proporção de 1:1,5 (g de tecido: mL de tampão fosfato – 50 mM, pH 7,4).

O homogenato foi centrifugado a 3500 rpm a -4°C (Centrifuge 5427 R, refrigerada) durante 15 minutos e o sobrenadante obtido, contendo ácidos graxos poliinsaturados, foi utilizado. Para a quantificação de TBARS 100 µL de homogenato de cérebro de rato foram incubados com 50 µL de diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20mg/mL) de cada extrato, a 37°C, durante 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 350 µL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,36%) e, incubados por 1 hora a 85°C. Em seguida, os tubos

foram resfriados em banho de gelo e centrifugados a 500xg durante 15 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placas multi (Detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Vermont, EUA) a 532 nm. Foi usado como padrão externo o 1,1,3,3-tetraetoxiopropano (TEP) e o nível de peróxidos lipídicos, expresso como μmol de TBARs por mL de extrato (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979).

2.5.6. Eliminação de óxido nítrico

O NO foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (SNP, 20 mmol/L) em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4). Uma vez gerado, o NO interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos por meio da reação de Griess, de acordo com o método de Basu et al. (2006) com modificações. Em uma microplaca foi adicionada a mistura reacional contendo 50 μL da amostra em diferentes concentrações (0,25; 0,5; 1; 2mg/mL) e 50 μL SNP (20 mmol/L) em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4), incubada a 37°C, por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm em leitor de placas e os resultados, expressos em quantidade de íons nitrito produzida.

2.6. Análise em espectrometria de massas - ESI-FT-MS Exactive Plus

Os EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP da pitomba foram analisados por ionização, por eletrospray e espectrometria de massas com transformada de Fourier nos modos de íons positivo e negativo (ESI-FT-MS). Estas análises foram realizadas dissolvendo a amostra numa mistura de tolueno/metanol (1: 1 v/v) para produzir uma solução final de 5 ppm. Os dados do ESI-FT-MS foram coletados em um espectrômetro de massas HCD (dissociação colisional de alta energia) Exactive Plus (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com as seguintes condições: tensões capilares a +3,8 e -3,2 kV, nível de RF S-lente em 80 e

temperatura capilar em 320 °C. Nitrogênio foi usado como gás de nebulização. A aquisição MS foi operada no modo Full Scan MS com uma resolução de 140.000 FWHM em 200 m/z na faixa de m/z 150-1800 Da usando o software Xcalibur 3.0 e um total de 150 μ scan acumulado em cada execução. Os espectros finais de massas para cada amostra foram obtidos a partir da subtração de espectros de massas do branco do solvente. A identificação dos íons em modo negativo foi obtida comparando os valores de m/z nos espectros de massa obtidos por ESI(-)-FT-MS com uma biblioteca de compostos do software PetroMS. A correspondência de fórmula molecular foi considerada quando o erro de massa entre m/z experimental e m/z teórico do valor da biblioteca foi menor que 3 ppm (Rathsack, Kroll, & Otto, 2014).

2.7. Citotoxicidade

Linhagem celular

A linhagem celular L929 (fibroblasto) foi cultivada em meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) e mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a uma temperatura de 37°C.

Preparação das células

As células foram desprendidas da garrafa de cultivo celular com a utilização de Tripsina a 0,25% (dissolvida em meio DMEM), contadas e colocadas em placas de 96 poços numa concentração de 2×10^4 células/poço. Após um período de 24 horas de incubação em estufa, para adesão das células a placa, as células foram tratadas com os EEtOH da casca e da polpa da Pitomba nas concentrações de 200 μ g/mL a 12,5 μ g/mL por 24h. Após 24h de tratamento foi realizado o ensaio de citotoxicidade por MTT.

Ensaio de MTT

O ensaio consiste na redução do MTT (Methyl-thiazolyl-tetrazolium), pela mitocôndria das células viáveis, em cristais de Formazan que possui uma coloração azulada. A placa foi lavada duas vezes com PBS e em seguida foram adicionados 200 µL do MTT em cada poço, a placa foi então incubada por 3 horas, o MTT foi retirado e dissolvido com DMSO por 10 minutos, após esse tempo foi realizada a leitura em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm. (Alley et al., 1988; Denizot & Lang, 1986; Mosmann, 1983). O resultado foi expresso em % de viabilidade celular, pela equação abaixo:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}} \times 100)$$

2.8. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para análise estatística dos dados dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e citotoxicidade, foram utilizados a Anova pós teste de Tukey ($p < 0,05$) usando-se o software Graphpad Prism (6.0). Os dados obtidos a partir da análise em espectrômetro de massas ESI (-)-FT-MS foram processados no software PetroMS (2.3.0).

3. Resultados e discussão

3.1. Compostos fenólicos totais e flavonoides totais

O teor de compostos fenólicos (Figura 1) dos EEtOHC ($5,9 \pm 0,07$ µg GAE/mg de extrato) e EHexC ($1,9 \pm 0,04$ µg GAE/mg de extrato) é praticamente 3 vezes superior aos dos EEtOHP ($1,2 \pm 0,08$ µg GAE/mg de extrato) e EHexP ($0,8 \pm 0,06$ µg GAE/mg de extrato), respectivamente ($p < 0,05$).

O teor de flavonoides (Figura 2) dos extratos da polpa (EEtOH- $0,96 \pm 0,01$ e EHex- $1,28 \pm 0,04$ µg CE/mg de extrato) foram inferiores ao da casca (EEtOH- $19,12 \pm 0,04$ e EHex- $9,47 \pm 0,32$ µg CE/mg de extrato).

É notório que compostos fenólicos e flavonoides são substâncias com elevada capacidade antioxidante, tal atividade se deve principalmente às suas propriedades de oxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, demonstram ainda propriedades antiproliferativa e anti-inflamatória (Soethe et al., 2016; Gutiérrez-Grijalva et al., 2018).

Neri-numa et al (2014) analisaram a polpa de pitomba e o teor de compostos fenólicos totais $105,84 \pm 2,05$ mg GAE/g e flavonoides totais foi de $88,05 \pm 0,4$ mg CE/g. Enquanto Queiroz et al (2015) analisaram compostos fenólicos da polpa e casca da lichia *in natura* 21,20 e 22,04 mg de Equivalente em ácido tânico/ 100 g, respectivamente.

3.2. Análise por espectrometria de Massa - ESI-FT-MS

No espectro do EEtOH da polpa de pitomba (Figura 3) foi identificado o ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), um composto intermediário do ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico, encontrado principalmente em frutas cítricas como limão, tangerina e laranja. Seu uso na indústria alimentícia é disseminado, sendo muito utilizado como conservante natural, atuando também na prevenção da oxidação lipídica (Soccol et al., 2006; Dhillon et al., 2013; Martínez et al., 2018).

Estudos recentes apontam que além do seu papel na indústria, o citrato demonstrou ter efeito na redução do estresse oxidativo, efeitos antioxidantes e antiinflamatórios via sistemas de transdução de sinal, bem como, redução da peroxidação lipídica e melhora da função endotelial (Bryland et al., 2012; Abdel-Salam et al., 2014; Martínez et al., 2018).

No espectro do EEtOHC da pitomba (Figura 4) foi identificada a rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$), um flavonoide. Diversos estudos apontam que este exerce atividade antioxidante, citoprotetora, vasoprotetora, neuroprotetora, atividade anticarcinogênica e efeito anti-

inflamatório (Becho et al., 2009; Nieoczym et al., 2014; Ganeshpurkar; Saluja, 2017; Kirschweng et al., 2018).

Os espectros de massas da polpa e da casca da pitomba obtidos por ESI(-)-FT-MS e processados no *software* PetroMS confirmaram a presença de classes de compostos oxigenados na faixa de O₁-O₁₀; e classes de compostos O₃S, O₅S e O₆S. Na Figura 5. são destacadas regiões com número de carbono e número de insaturações na molécula (DBE) característicos de compostos aromáticos. Assim sendo, a junção dessas duas variáveis confirma a presença de compostos fenólicos e flavonoides. Vale ressaltar que a técnica de ESI(-)-FT-MS aplicada por infusão direta tem a característica de análise qualitativa e não quantitativa.

Reconhecer estas classes de compostos é crucial, uma vez que estes têm atividade antioxidante e antimutagênica conhecidas, atuam na absorção e neutralização de radicais livres, na redução da oxidação lipídica. Estudos apontam papel importante na redução da ocorrência de patologias como câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares, diabetes, artrite (Achkar et al., 2013; Corrêa et al., 2015; Soethe et al., 2016; Gutiérrez-Grijalva et al., 2018).

3.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante pode ser determinada por diferentes métodos com mecanismos distintos, incluindo transferência de elétrons, quelação de metais, entre outros. Dentre estes, estão os modelos sistemas de sequestro de radicais DPPH• e ABTS•, co-oxidação β-caroteno/ácido linoleico, de capacidade de redução do ferro (FRAP), de medida da lipoperoxidação pela produção TBARs e de redução do óxido nítrico. Cabe destacar que apenas um método não é suficiente para predizer que determinado composto tem capacidade

antioxidante, e deve-se, portanto, associar protocolos baseados em diferentes mecanismos de ação, visto que são diversos os tipos de radicais livres e a forma como os mesmos atuam no organismo (Alves et al., 2010; Shahidi et al., 2015; Meng et al., 2017).

3.2.1. Varredura do radical DPPH•

O método de varredura do radical DPPH• avalia a capacidade antioxidante por meio a transferência de elétrons dos compostos presentes nos extratos para o radical, tornando-o estável (Duarte-Almeida et al., 2006). Na figura 6. estão apresentados os resultados da determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•. Os EEtOHC, EHexC e EEtOHP, EHexP da pitomba em diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL), demonstraram atividade antioxidante com efeito concentração-dependente e percentuais superiores ao do sistema (solução do radical DPPH• sem o antioxidante), $p < 0,05$.

Comparando-se os extratos da polpa e casca nota-se que a casca apresenta elevado percentual de varredura do radical DPPH• variando de 30,98 a 72,70% para o EHexC e 54,21 a 81,41 % para o EEtOHC, enquanto a polpa variou de 4,26 a 22,07 % EHexP e 15,10 a 29,33 EEtOHP.

Outros autores analisaram frutos pertencentes à mesma família da pitomba pelo método de sequestro do radical DPPH. Extratos metanólicos da casca e da polpa *in natura* de *Litchi chinensis* apresentaram 87,18% e 31,71% de capacidade antioxidante, respectivamente (Queiroz et al., 2015). Contudo, o extrato metanólico dos frutos de *Paullinia cuppana* resultou em percentual de varredura de 90,9 % (Jiang et al., 2013).

3.3.2. Captura do radical ABTS•

O método de captura do radical ABTS também tem como princípio a transferência de elétrons. A captação do radical ABTS pelos EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP da pitomba em concentrações distintas (2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL) estão demonstrados na figura 7.

Em ambos os extratos o aumento da inibição da atividade do radical ABTS• foi concentração-dependente ($p < 0,05$) (Figura 7).

Todos os extratos quando comparados tiveram diferença significativa entre si e entre as concentrações ($p < 0,05$). Contudo o percentual de inibição do radical ABTS• do EEtOHC e EHexC foram superiores ao da polpa, ou seja, variando de 78,16 a 94,07% e 21,65 a 90,88%, respectivamente, enquanto para EEtOHP e EHexP variou de 3,83 a 29,13% e 2,63 a 18,99%, respectivamente.

Vale destacar que todos os extratos diferiram do sistema (solução do radical ABTS• sem a amostra) ($p < 0,05$). Os extratos etanólicos apresentaram percentuais de varredura do radical ABTS superiores aos extratos hexânicos para esse método, assim como para o método de varredura do radical DPPH ($p < 0,05$).

3.3.3. Capacidade redutora do ferro (FRAP)

Os resultados para o método FRAP estão apresentados na figura 8. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas as concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL) dos extratos com o sistema (reagente FRAP sem a amostra), também entre os EEtOHP com o EEtOHC e EHexP e EHexC da pitomba. Em contrapartida, nas concentrações 2,5 e 5 mg/mL do EHexP e nas concentrações 5 e 10 mg/mL do EEtOHP, a capacidade de redução do ferro foi similar ($p > 0,05$).

Os EEtOHC e EHexC da pitomba expressaram maior capacidade em reduzir o Fe^{3+} , na maior concentração (20 mg/mL), apresentando redução de 1573,77 e $975,33 \pm 1,16 \mu\text{mol}$ de $\text{Fe}^{2+}\text{SO}_4/\text{mL}$ de extrato, respectivamente.

Alguns frutos nativos do Brasil e com capacidade antioxidante melhor conhecida, como o murici (*Byrsonima crassifolia*), mangaba (*Hancornia speciosa*) e caju (*Anacardium occidentale*), foram avaliados pelo método FRAP. O extrato etanólico da polpa do murici 148,42±0,047 μmol de $\text{Fe}^2\text{SO}_4/\text{g}$ (Morais et al., 2013). Os extratos aquosos de caju e de mangaba revelaram resultados de $154 \pm 7,8$ μmol de $\text{Fe}^2\text{SO}_4/\text{g}$ e $163 \pm 11,7$ μmol de $\text{Fe}^2\text{SO}_4/\text{g}$, respectivamente (Rufino et al., 2010).

Este método avalia o quanto os compostos presentes nos extratos são capazes de reduzir o ferro da sua forma férrica a ferrosa. O EEtOHC da pitomba apresentou elevada capacidade em reduzir o ferro. No organismo a forma férrica está envolvida em diversos em diversos processos oxidativos, inclusive participando da reação de Fenton quando reage com o peróxido de hidrogênio formando espécies com capacidade oxidante como o radical hidroxila, radical que está envolvido com danos ao DNA, as proteínas, lipídios (Neyens et al., 2003; Nogueira et al., 2007).

3.3.4. Co-oxidação do sistema β -caroteno/Ácido linoleico

Os percentuais de proteção da oxidação para os EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP da pitomba estão representados na figura 9.

Todos os extratos diferiram significativamente do sistema (solução emulsificante sem a amostra) ($p < 0,05$) em todas as concentrações (0,5; 1; 2,5; 5; 10 mg/mL). Nota-se que os percentuais de inibição foram crescentes à medida que a concentração aumentava para cada extrato ($p < 0,05$), havendo assim efeito concentração-resposta, exceto entre as concentrações 1 e 2,5 mg/mL do EEtOHP, que quando comparados entre si foram similares (32,62 e 33,92 % de proteção da oxidação, respectivamente) ($p > 0,05$).

O EEtOHC nas suas maiores concentrações 5 e 10 mg/mL apresentou elevado percentual de proteção da oxidação de 80,31% e 84,91%, respectivamente ($p < 0,05$).

Rufino et al. (2010) analisaram o extrato aquoso da polpa de caju e o percentual de proteção da oxidação foi de $25 \pm 8,9\%$. No estudo de Moraes et al. (2013) o extrato etanólico da polpa do murici, assim como os extratos do presente estudo, teve efeito concentração-dependente, e nas concentrações de 500, 1000 e 1500mg/L apresentou percentual de inibição da oxidação de $52,40 \pm 0,05\%$; $63,46 \pm 0,03\%$ e $67,79 \pm 0,03\%$, respectivamente.

3.3.5. Lipoperoxidação espontânea (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS)

A quantidade de TBARs produzidas em relação às concentrações (2,5; 5; 10; 15; 20 mg/mL) dos EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP da pitomba está ilustrada na figura 10. Os EEtOH e EHex da polpa diferiram em apenas duas concentrações (15 e 20 mg/mL) ($p < 0,05$), sendo similares nas demais concentrações. O EEtOHC e EHexC diferiram apenas na concentração de 2,5 mg/mL.

Os EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP na maioria das concentrações não diferiram entre si ($p > 0,05$). No entanto, nota-se que todos os extratos reduziram o percentual de lipoperoxidação quando comparados com o sistema (meio reacional sem a presença de antioxidantes) ($p < 0,05$).

Omena et al. (2012) analisaram o extrato etanólico de polpa, casca e semente dos frutos brasileiros umbu, jenipapo e siriguela, considerando as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, e encontraram inibição da produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico com resultado também concentração-dependente.

A oxidação lipídica está atrelada a inúmeras doenças incluindo aterosclerose, câncer, artrite reumatóide e distúrbios neurodegenerativos, como Alzheimer. Ressalta-se que a análise da inibição da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é um dos métodos que assemelha-se ao sistema *in vivo* visto que estima a peroxidação dos lipídios causada pela

produção exacerbada de radicais livres nas membranas e sistemas biológicos (Ghani et al., 2017; Costa et al., 2012; Neto et al., 2013).

Os extratos da casca e polpa não diferiram estatisticamente na maioria das concentrações ($p > 0,05$), diferentemente do verificado nos sistemas DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico, pode-se sugerir que, os compostos presentes na casca da pitomba têm atividade mais relacionada à doação de elétrons para os radicais ABTS, DPPH e Fe^{3+} quando comparados aos da polpa, e ambas as frações (casca e polpa) são semelhantes quanto a estabilizar radicais peroxil (Pertuzzati et al. 2014).

3.3.6. Redução do Óxido Nítrico (NO)

Os resultados para o teste de redução do NO estão demonstrados na figura 11. Os EEtOHP e EHexP da pitomba diferiram apenas na concentração de 1mg/mL ($p < 0,05$), sendo similares nas demais concentrações. O EEtOHC e EHexC diferiram nas concentrações de 1 e 2 mg/mL.

Não obstante, mesmo os extratos não diferindo na maioria das concentrações e entre os extratos, nota-se que a produção de íons nitrito decaiu em todas das concentrações dos EEtOH e EHex da casca e polpa da pitomba quando comparado com o sistema ($p < 0,05$).

EEtOHP e EHexP apresentaram maior redução da produção de íons nitrito, quando comparados aos EEtOHC e EHexC, exceto na menor concentração de ambos os extratos 0,25 mg/mL.

Este também é um dos métodos *in vitro* que também assemelha-se ao que ocorre nos sistemas *in vivo*, e nesta metodologia é avaliada a capacidade do antioxidante presente na amostra em eliminar os íons nitritos produzidos durante a reação. O óxido nítrico, quando produzido em excesso, pode estar envolvido no desenvolvimento de patologias como artrite, asma, esclerose múltipla, Alzheimer, portanto a inibição deste por agentes antioxidantes

representa uma estratégia terapêutica benéfica (Costa et al., 2012; Neto et al., 2013; Barman et al., 2014).

A capacidade antioxidante demonstrada pelos EEtOHC, EHexC, EEtOHP e EHexP pode ser atribuída aos compostos presentes nos extratos como os compostos fenólicos totais e flavonoides totais (Figura 1, 2 e 5), além de alguns compostos identificados por espectrometria de massas (Figura 3 e 4) como o ácido cítrico no EEtOH da polpa e a rutina no EEtOH da casca. Estes compostos têm sido associados à risco reduzido de doenças como diabetes tipo 2, cardiovasculares, obesidade, certos tipos de câncer, síndrome metabólica, doenças neurodegenerativas, entre outras (Barba et al., 2017; Alu'Datt., 2017; Pisochi & Pop, 2015).

3.4. Citotoxicidade

Os resultados para o teste de citotoxicidade dos EEtOHC e EEtOHP da pitomba estão demonstrados na Figura 12. Nota-se que o percentual de viabilidade não teve relação dose-dependente e não houve diferença significativa entre as concentrações.

A amostra é considerada citotóxica quando o percentual de viabilidade das células expostas é inferior a 70% (Teixeira et al., 2005; Cerqueira et al., 2008). Verificou-se que os EEtOH da casca e polpa não apresentaram efeitos citotóxicos, visto que, o percentual de viabilidade celular destes foi superior a 80 % em todas as concentrações, não diferindo do controle ($p < 0,05$).

Ressalta-se que a dosagem da citotoxicidade é fundamental para estabelecer o quanto um produto (natural ou sintético) pode ser tóxico para uma determinada célula. Assim, os resultados obtidos por meio deste, podem ser analisados para definir a possibilidade de ensaios *in vivo*, estabelecendo uma margem de segurança para o produto, no caso do presente

estudo os EEtOH da casca e polpa da pitomba, em relação às suas atividades biológicas (Santos et al., 2013; Sittisart & Chitsomboon, 2014).

4. Conclusões

Os extratos EEtOHC e EHexC da pitomba apresentaram capacidade antioxidante acentuada para os métodos DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico. E todos os extratos tiveram atividade semelhante para os métodos NO e TBARs. Nos extratos EEtOHC e EETOHP por meio da ESI- FT-MS foram identificados a rutina e o ácido cítrico, respectivamente. Estes resultados sugerem que os extratos da casca e polpa e mais efetivamente da casca têm considerável capacidade antioxidante e podem vir a ser utilizados como um novo antioxidante natural em alimentos. Os EEtOHC e EETOHP não apresentaram citotoxicidade um bom indicativo para futuros estudos *in vivo*. Logo, mais pesquisas são necessárias para avaliar a possibilidade de consumo da casca, visto que é uma fração até então inexplorada, faz-se necessário também a determinação da atividade antioxidante de ambas as frações *in vivo* e em cultura de células, para uma melhor avaliação de seus efeitos benéficos à saúde.

940 **Agradecimentos**

941 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo
942 apoio financeiro. Ao Condomínio de Laboratórios de Química Multiusuários e a Financiadora
943 de Estudos e Projetos (FINEP).

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

Referências

- Abdel-Salam, O.M.E., Youness, E.R., Nadia, A., Morsy, S.M.Y, Omara, E.A., & Sleem, A.A. (2014). Mohammed et al. Efeitos do ácido cítrico no estresse oxidativo cerebral e hepático em camundongos tratados com Lipopolissacarídeo. *Journal of Medicinal Food*, 17(5), 588-598.
- Achkar, M.T., Novaes, G.M., Silva, D.B., & Vilegas, W. (2013). Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 11, 398-406.
- Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., & Aguiar, R.M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10), 2202-2210.
- Alves, A.O., Cadoná, F.C., Assmann, C.E., Weis, G.C.C., Bonadiman, B.S.R., & Cruz, I.B.M. (2018). Quantificação de compostos bioativos em amostras de café, chás verde e preto, erva-mate, guaraná e sua relação com a diminuição da agregação plaquetária. *Congresso Internacional de Políticas Públicas de Saúde*, 1.
- Alley, M.C., Dominic A. S., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. & Boyd, M.R. (1988). Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Research*, 48, 589-601.
- Alu'Datt, M.H. (2017). A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chemistry*, 218, 99-106.
- Barba, F., Mariutti, L.R.B., Bragagnolo, N., Mercadante, A.Z., Barbosa-Cánovas, G.V., & Orlén V. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science & Technology*, 1-41.
- Barman, K., Siddiqui, M.W., Patel, V.D., & Prasad, M. (2014) Nitric oxide reduces pericarp browning and preserves bioactiveantioxidants in litchi. *Scientia Horticulturae*, 171, 71-77.
- Basu, S., & Hazra, B. (2006). Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. *Phytotherapy Research*, 20, 896-900.
- Bonfim, L.F.C., Costa, I.V.G., & Benvenuti, S.N.P. (2002). Projeto Cadastro da Infra-Estrutura Hídrica do Nordeste: Estado de Sergipe. Diagnóstico do Município de Areia Branca. Aracaju: CPRM.
- Brand-Willians, W., Cuvelier, M.E., & Brest, C. (1995). Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bryland, A., Wieslander, A., Carlsson, O., Hellmark, T., & Godaly, G. (2012) Citrate treatment reduces endothelial death and inflammation under hyperglycaemic conditions. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 9, 1-42.

- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 107-120.
- Celant, V.M., Braga, G.C., Vorpapel, J.A., Ariane, J., & Salibe, A.B. (2016). Phenolic composition and antioxidant capacity of aqueous and ethanolic extracts of blackberries. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(2), e-411.
- Cerqueira, F., Cidade, H., Ufford, L., Beukelman, C., Kijjoa, A., & Nascimento, M.S.J. (2008). The natural prenylated flavone artelastin is na inhibitor of ROS and NO production. *International Immunopharmacology* , 8, 597–602.
- Corrêa, V.G., Tureck, C., Locateli, G., Peralta, R.M., & Koehnlein, E.A. (2015). Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population. *Revista de Nutrição*, 28(2), 185-196.
- Costa, D.A., Oliveira, G.A.L., Sousa, D.P., & Freitas, R.M. (2012). Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas*, 33(4), 567-575.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89, 271-277.
- Dhillon, G.S., Kaur, S., Sarma, S.J., & Brar, S.K. (2013). Integrated process for fungal citric acid fermentation using apple processing wastes and sequential extraction of chitosan from waste stream. *Industrial Crops and Products* 50, 346-351.
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A.K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 149-164.
- Ghani, M.A., Barril, C., Bedgood D.R., & Prenzler. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances Assay. *Food Chemistry*, 1-50.
- Giulietti, A.M., Bocage-Neta, A.L., & Castro, A.A.J.F. (2004). Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. Biodiversidade da Caatinga: ações prioritárias para conservação. (pp.47-90).
- González-Aguilar, G.A., Blancas-Benítez, F.J., & Sáyago-Ayerdi, S.G. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*, 13, 84–88.
- Gutiérrez-Grijalva, E.P., Picos-Salas, M.A., Leyva-López, N., Criollo-Mendonza, M.S., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J.B. (2018). Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants*, 7, 1-23.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1-4.

- Haminiuk, C.W., Maciel, G.M., Plata-Oviedo, M.S.V., & Peralta, R.M. (2012). Phenolic compounds in fruits – an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 1-22.
- Jiang, G., Lin, S., Wen, L., Jiang, Y., Zhao, M., Chen, F., Prasad, K.N., Duan, X., & Yang, B. (2013). Identification of a novel phenolic compound in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp and bioactivity evaluation. *Food Chemistry*, 136, 563–568.
- Kirschweng, B., Tilinger, D.M., Hégely, B., Samu, G., Tátraaljai, D., Foldes, E., & Punkánszky, B. (2018). Melt stabilization of PE with natural antioxidants: Comparison of rutin and Quercetin. *European Polymer Journal*, 103, 228–237.
- Liu, R.H. (2013). Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. *American Society for Nutrition. Advances in Nutrition*, 4, 384–392.
- Martínez, A., Vargas, R., & Galano, A. (2018). Citric Acid: A Promising Copper Scavenger. *Computational & Theoretical Chemistry*, 1-17.
- Martins, N., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R. (2016) In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, 1-50.
- Melo, E.A., Maciel, M.I.A., Lima, V.L.A.G., & Nascimento, R.J. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(2), 193-201.
- Meng, D. (2017). Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. *Journal of Functional Foods*, 37, 467-479.
- Miller, H.E. (1971). Simplified method for evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 48, 1-91.
- Morais, M.L., Silva, A.C.R., Araújo, C.R.R., Esteves, E.A., & Dessimoni-Pinto, N.A.V. (2013). Determinação do potencial antioxidante in vitro de frutos do Cerrado brasileiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(2), 355-360.-360.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Navarro, D.D.F. (2005). Estudo químico biológico e farmacológico das espécies *Allamanda Blanchetti* *Allamanda Schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas Curso de Pós Graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina.293p.
- Neyens, E., & Baeyens, J. (2003). A review of classic Fenton's peroxidation as na advanced oxidation technique. *Journal of Hazardours Materials B*, 98, 33-50.
- Neri-Numa, I.A., Silva, L.B.C., Ferreira, J.E.M., Machado, A.R., Malta, L.G., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E., & Pastore, G.M. (2014). Preliminary of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia Esculenta*). *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1233-1238.

- Neto, J.D.N., Oliveira, G.A.L., & Sousa DP.(2013). Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas*, 34(1), 125-130.
- Nieoczym, K., Socała, G., Raszewski, P., & Wlaz, P.(2014). Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice *Progress in Neuro-psychopharmacol. Biololical Psychiatry*, 54, 50-58.
- Nogueira, R.F.P, Trovó, A.G., Silva M.R.A., & Villa, R.D. (2007). Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. *Quim. Nova*, 30, 400-408.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351–358.
- Oliveira, V.B., Zuchetto, M., Oliveira, C.F., Paula, C.S., Duarte, A.F.S., Miguel, M.D., & Miguel, O.G. (2016). Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 18, 230-239.
- Omena, C.M.B., Valentim, I.B., Guedes, G.S., Mano, C.M., Bechara, E.J.H., Sawaya, A.C.H.F., Trevisan, M.T.S., & Costa, J.G. (2012). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. *Food Research International*, 49, 334–344.
- Pertuzatti, P.B., Barcia, T.M., Rodrigues, D., Cruz, P.N., Gutiérrez, I.H., Smith, R., & Godoy, H.T. (2014). Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian Blueberries. *Food Chemistry*, 164, 81–88.
- Pires, T.C.S.P., Dias, M.I., Barros, L., Calhelha, R.C., Alves, M.J., Oliveira, B.P.P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.R.F. (2017).Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactivepotential. *Food Research International*, 1-37.
- Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97, 55-74.
- Queiroz, E.R., Abreu, C.M.P., Santos, C.M., & Simão, A.A. (2015). Composição química e fitoquímica das farinhas da casca e da semente de lichias (*Litchi chinensis* Sonn) cultivar 'Bengal'. *Ciência Rural*, 45(2), 329-334.
- Rathsack, P., Kroll, M.M., & Otto, M. (2014). Analysis of high molecular compounds in pyrolysis liquids from a german brown coal by FT-ICR-MS. *Fuel*, 115, 461–468.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., YanM., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rufino, M.S., Alves, R.E., Brito, E.S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996–1002.

- Santos, T.C., Júnior, J.E.N., & Prata, A.P.N. (2012). Frutos da Caatinga de Sergipe utilizados na alimentação humana. *Scientia Plena*, 8, 1-7.
- Santos, K.K.A., Rólon, M., Veja, C., Arias, A.S., Costa, J.G.,M., & Coutinho, H.D. (2013). Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34, 47-50.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
- Singhal, M., Paul, A., & Singh, H.P. (2014). Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18, 121-127.
- Sittisartl, P., Chitsomboon, B. (2014). Intracellular ROS Scavenging Activity and Downregulation of Inflammatory Mediators in RAW264.7 Macrophage by Fresh Leaf Extracts of *Pseuderanthemum palatiferum*. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.
- Soccol, C.R., Vendenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New perspectives of citric acid production and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 141-149.
- Soethe, C. S, Steffens, C.A., Amarante, C.V.T., Martin, M.S., & Bortolini, A.J. (2016). Qualidade, compostos fenólicos e atividade antioxidante de amoras-pretas 'Tupy' e 'Guarani' armazenadas a diferentes temperaturas. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 51, 950-957.
- Sousa, M.S.B., Vieira, L.M., & Lima, A. (2011). Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14(3), 202-210.
- Souza, M.P., Bataglion, G.A., Silva, F.M.A., Paz, W.H.P., Nobre, T.A., Marinho, J.V.N., Salvador, M.J., Fidelis, C.H.V., Acho, L.D.R., Souza, A.D.L., Nunomura, R.C.S., Eberlin, M.N., Lima, E.S., & Koolen, H.H.F. (2016). Phenolic aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk) assessed by LC-MS/MS and HS-SPME/GC-MS. *Food Research International*, 83, 87-94.
- Teixeira, M., Cerqueira, F., Barbosa, C.M., Nascimento, M.S.J., & Pinto, M. (2005). Improvement of the inhibitory effect of xanthones on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. *Journal of Drug Targeting*, 13, 129-135.
- Virgolin, L.B., Seixas, F.R.F., & Janzantti, N.S. (2017). Composition, content of bioactive compounds, and antioxidant activity of fruit pulps from the Brazilian Amazon biome. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52(10), 933-941.

Legendas das figuras

Figura 1. Fenólicos totais, expresso em μg de equivalente de ácido gálico/mg de extrato. Resultados expressos em média ($n=3$) \pm Desvio padrão. EEtOH = Extrato etanólico; EHex = Extrato hexânico.

Figura 2. Flavonoides totais, expresso em μg de equivalente de catequina/mg de extrato. Resultados expressos em média ($n=3$) \pm Desvio padrão. EEtOH = Extrato etanólico; EHex = Extrato hexânico.

Figura 3. Espectro do extrato etanólico da polpa da pitomba gerado após análise por espectrometria de massas - ESI-FT-MS.

Figura 4. Espectro do extrato etanólico da casca da pitomba gerado após análise por espectrometria de massas - ESI-FT-MS.

Figura 5. Classes de compostos dos extratos etanólicos e hexânicos da casca e polpa da pitomba analisados por espectrometria de massas - ESI-FT-MS. DBE- número de insaturações; P.C.E.E – Extrato etanólico da casca da pitomba; P.C.E.H- Extrato hexânico da casca da pitomba; P.P.E.E- Extrato etanólico da polpa da pitomba; P.P.E.H- Extrato hexânico da polpa da pitomba.

Figura 6. Percentual de varredura do radical DPPH•, em função das concentrações, por extratos etanólico e hexânicos obtidos a partir da casca e polpa de pitomba liofilizadas comparado com o sistema e padrão trolox. Resultados expressos em média ($n=3$) \pm Desvio padrão. EEtOH = Extrato etanólico; EHex = Extrato hexânico. T=Trolox, como antioxidante padrão. *** $p<0,05$ diferença significativa: extrato vs sistema (meio reacional sem o antioxidante); ### $p<0,05$, diferença significativa: extrato vs padrão Trolox; + $p<0,05$ diferença significativa entre cada concentração do mesmo extrato; ++ $p<0,05$: diferença significativa entre concentrações iguais de extratos diferentes.

Figura 7. Percentual de inibição do radical ABTS•, em função das concentrações, por extratos etanólico e hexânicos obtidos a partir da casca e polpa de pitomba liofilizadas comparado com o sistema e padrão trolox. Resultados expressos em média ($n=3$) \pm Desvio padrão. EEtOH = Extrato etanólico; EHex = Extrato hexânico. T=Trolox, como antioxidante padrão. *** $p<0,05$ diferença significativa: extrato vs sistema (meio reacional sem o antioxidante); ### $p<0,05$, diferença significativa: extrato vs padrão Trolox; + $p<0,05$ diferença significativa entre cada concentração do mesmo extrato; ++ $p<0,05$: diferença significativa entre concentrações iguais de extratos diferentes.

Figura 8. Capacidade redutora do ferro- FRAP, em função das concentrações, por extratos etanólico e hexânicos obtidos a partir da casca e polpa de pitomba liofilizadas comparado com o sistema e padrão trolox. Resultados expressos em média ($n=3$) \pm Desvio padrão. EEtOH = Extrato etanólico; EHex = Extrato hexânico. T=Trolox, como antioxidante padrão. *** $p<0,05$ diferença significativa: extrato vs sistema (meio reacional sem o antioxidante); ### $p<0,05$, diferença significativa: extrato vs padrão Trolox; + $p<0,05$ diferença significativa entre cada concentração do mesmo extrato; ++ $p<0,05$: diferença significativa entre concentrações iguais de extratos diferentes.

Figura 9. Percentual de proteção da oxidação, em função das concentrações, por extratos etanólico e hexânicos obtidos a partir da casca e polpa de pitomba liofilizadas comparado com o sistema e padrão trolox. Resultados expressos em média ($n=3$) \pm Desvio padrão. EEtOH = Extrato etanólico; EHex = Extrato hexânico. T=Trolox, como antioxidante padrão. *** $p<0,05$ diferença significativa: extrato vs sistema (meio reacional sem o antioxidante); ### $p<0,05$, diferença significativa: extrato vs padrão Trolox; + $p<0,05$ diferença significativa entre cada concentração do mesmo extrato; ++ $p<0,05$: diferença significativa entre concentrações iguais de extratos diferentes.

Figura 10. Conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, produzidas durante peroxidação lipídica espontânea, em função das concentrações, por extratos etanólico e hexânicos obtidos a partir da casca e polpa de pitomba liofilizadas comparado com o sistema e padrão trolox. Resultados expressos em média ($n=3$) \pm Desvio padrão. EEtOH = Extrato etanólico; EHex = Extrato hexânico. T=Trolox, como antioxidante padrão. *** $p<0,05$ diferença significativa: extrato vs sistema (meio reacional sem o antioxidante); ### $p<0,05$, diferença significativa: extrato vs padrão Trolox; + $p<0,05$ diferença significativa entre cada concentração do mesmo extrato; ++ $p<0,05$: diferença significativa entre concentrações iguais de extratos diferentes.

Figura 11. Produção de íons nitrito, em função das concentrações, por extratos etanólico e hexânicos obtidos a partir da casca e polpa de pitomba liofilizadas comparado com o sistema e padrão trolox. Resultados expressos em média ($n=3$) \pm Desvio padrão. EEtOH = Extrato etanólico; EHex = Extrato hexânico. T=Trolox, como antioxidante padrão. *** $p<0,05$ diferença significativa: extrato vs sistema (meio reacional sem o antioxidante); ### $p<0,05$, diferença significativa: extrato vs padrão Trolox; + $p<0,05$ diferença significativa entre cada concentração do mesmo extrato; ++ $p<0,05$: diferença significativa entre concentrações iguais de extratos diferentes.

Figura 12. Efeito do EEtOH da casca (A) e polpa (B) na viabilidade celular de células L929. O efeito do EEtOH da casca (A) e polpa (B) na viabilidade celular foi avaliado pelo MTT. Os valores são expressos como médias \pm desvio padrão ($n = 3$) e são representativos de três experimentos independentes com resultados semelhantes. Letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$), conforme determinado pelo Anova.

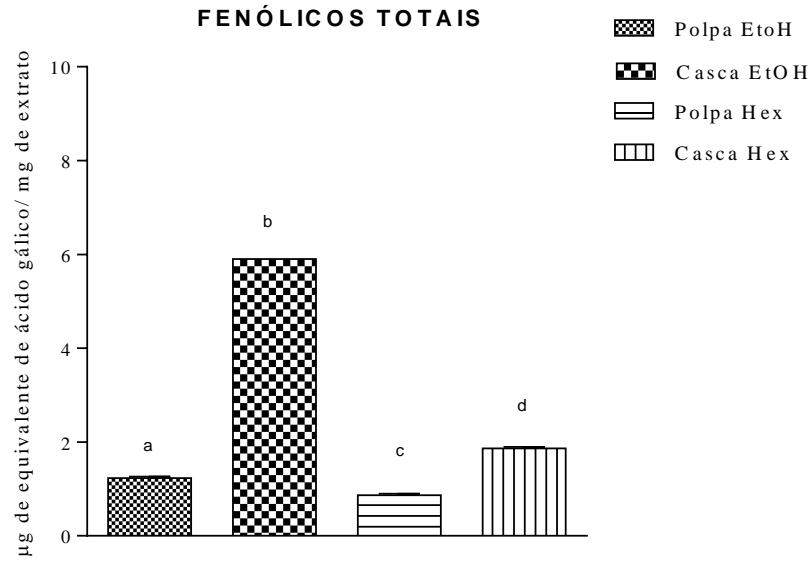


Figura 1.

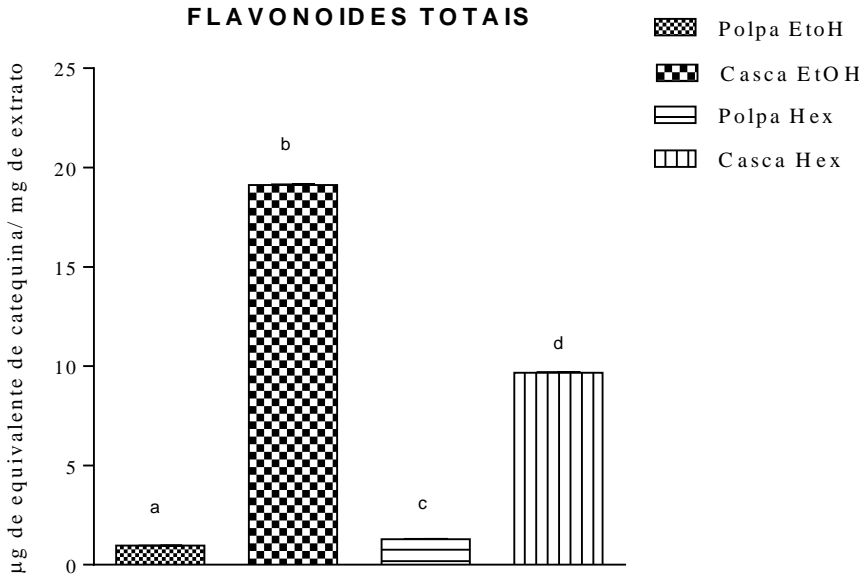


Figura 2.

Pitorba polpa extrato etanolico 5 ppm-qb negative #1 RT: 16.96 AV: 1 NL: 1.36E8
T: FTMS - pESI Full ms [150.0000-1800.0000]

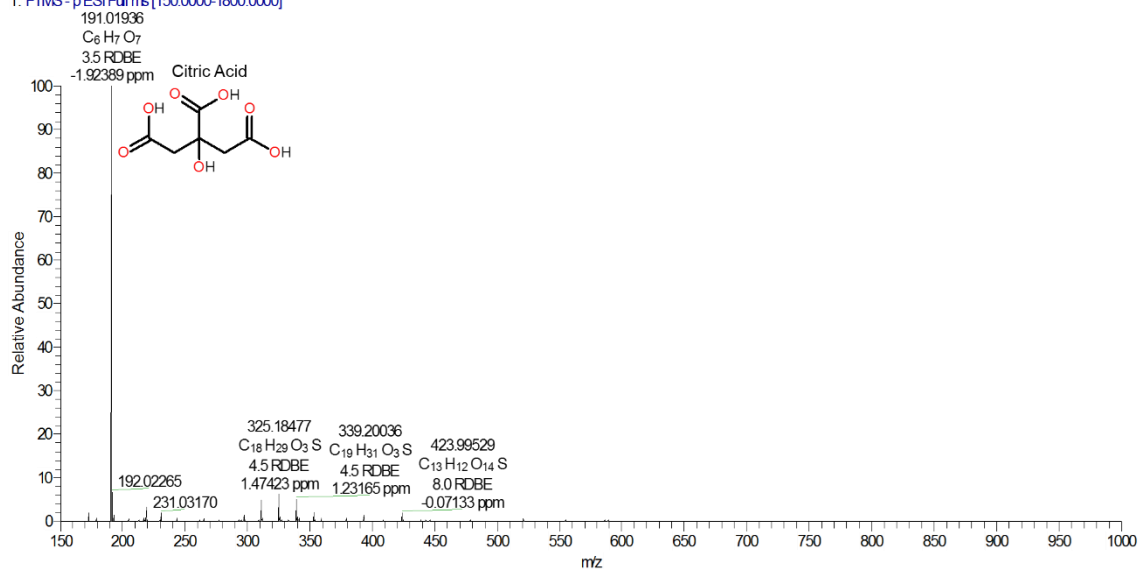


Figura 3.

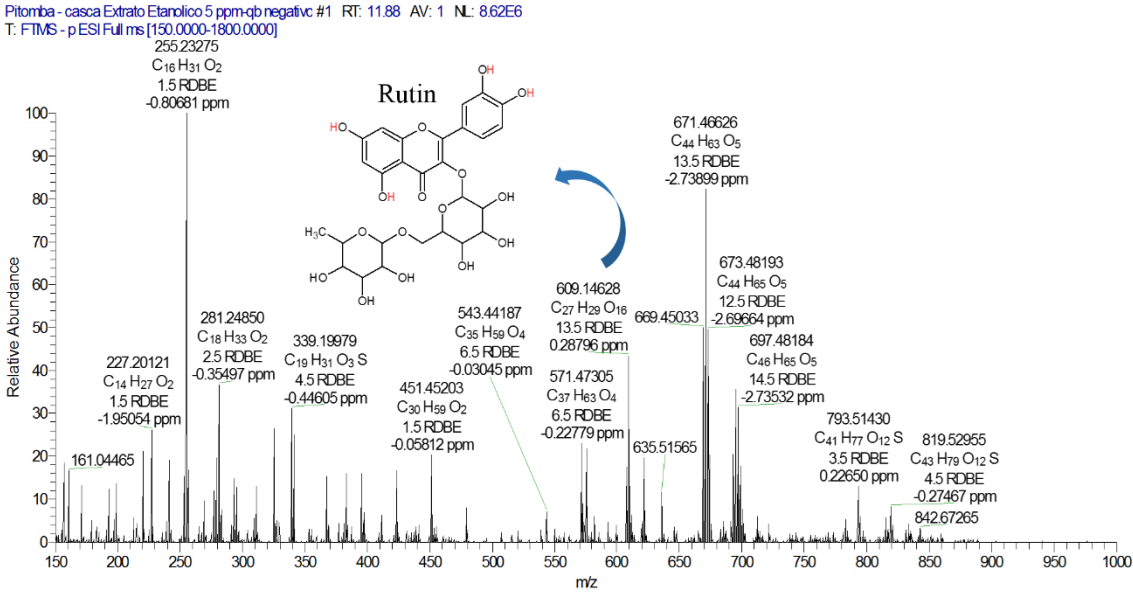
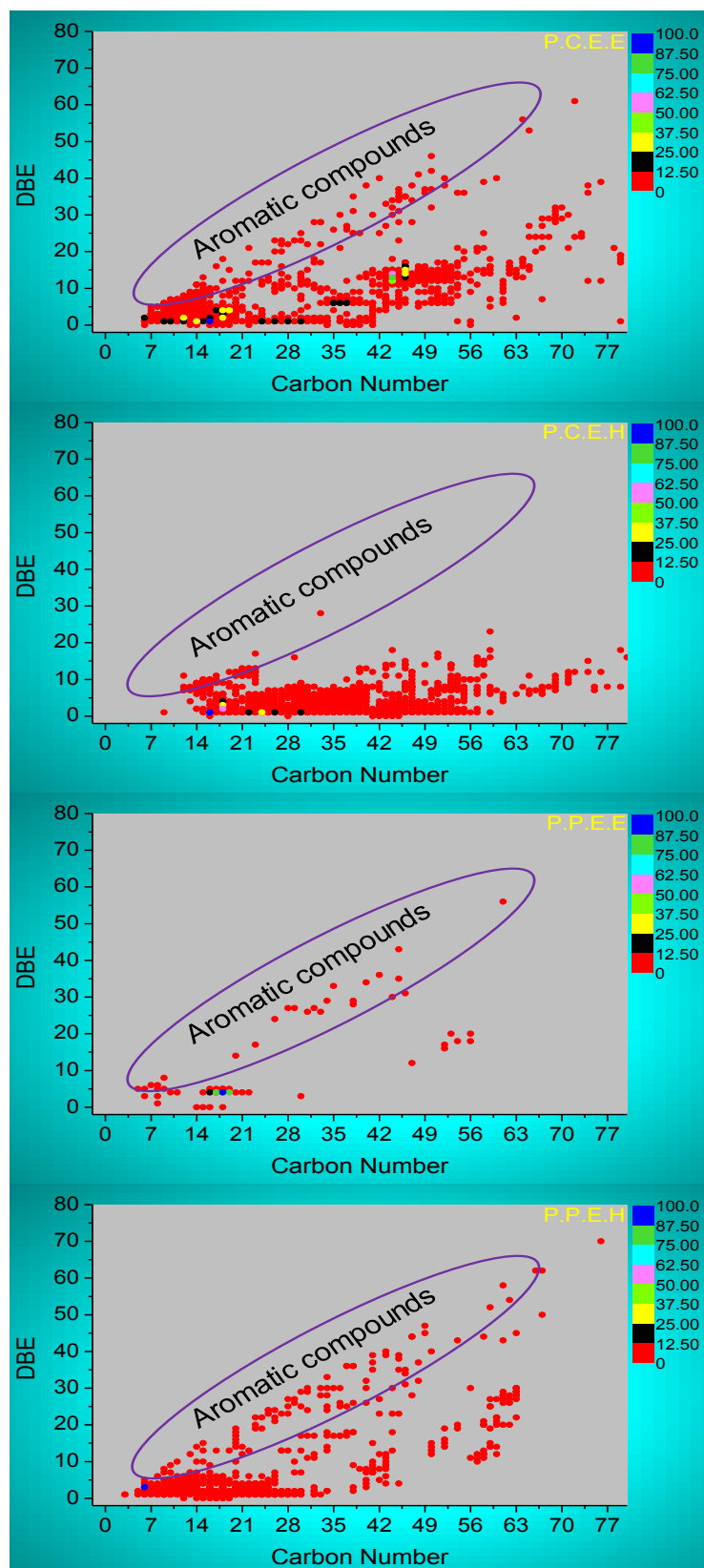


Figura 4.



1379

1380 Figura 5.

1381

1382

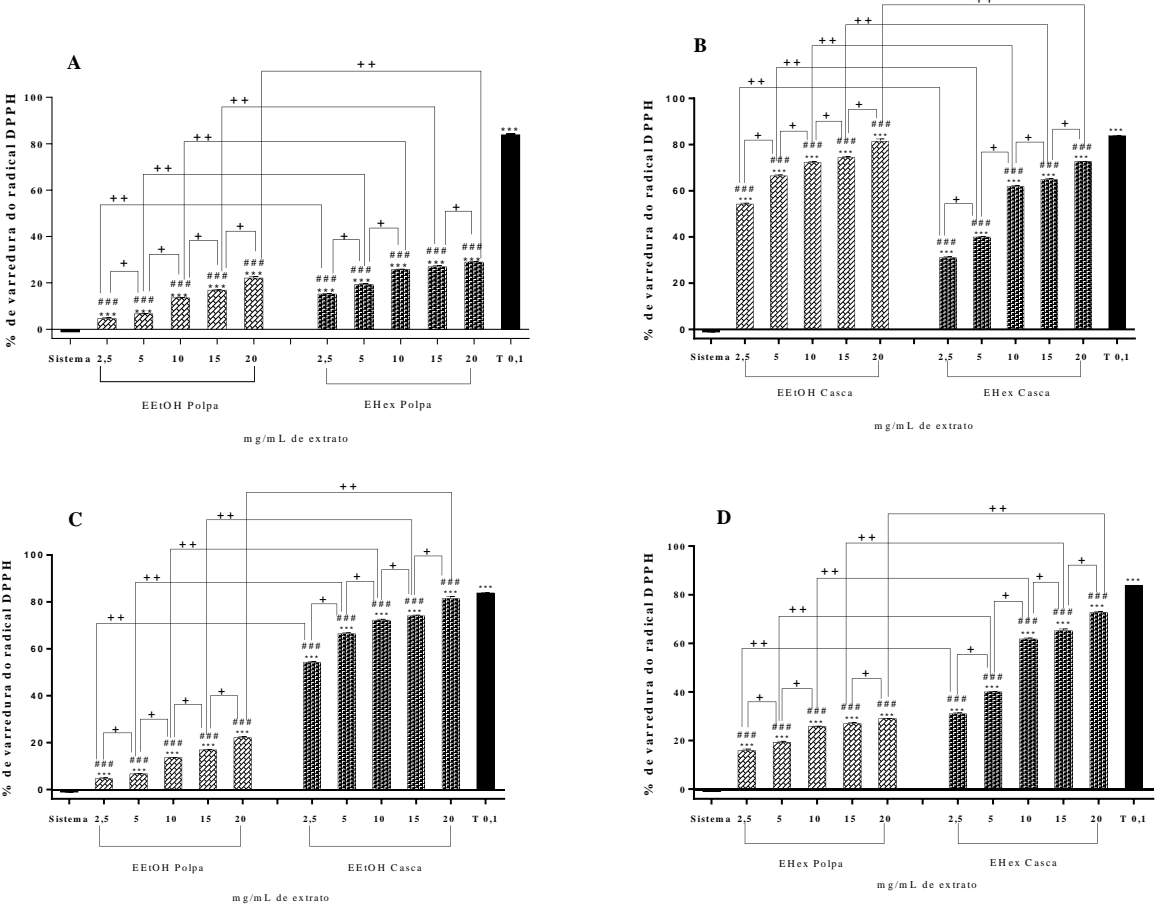


Figura 6.

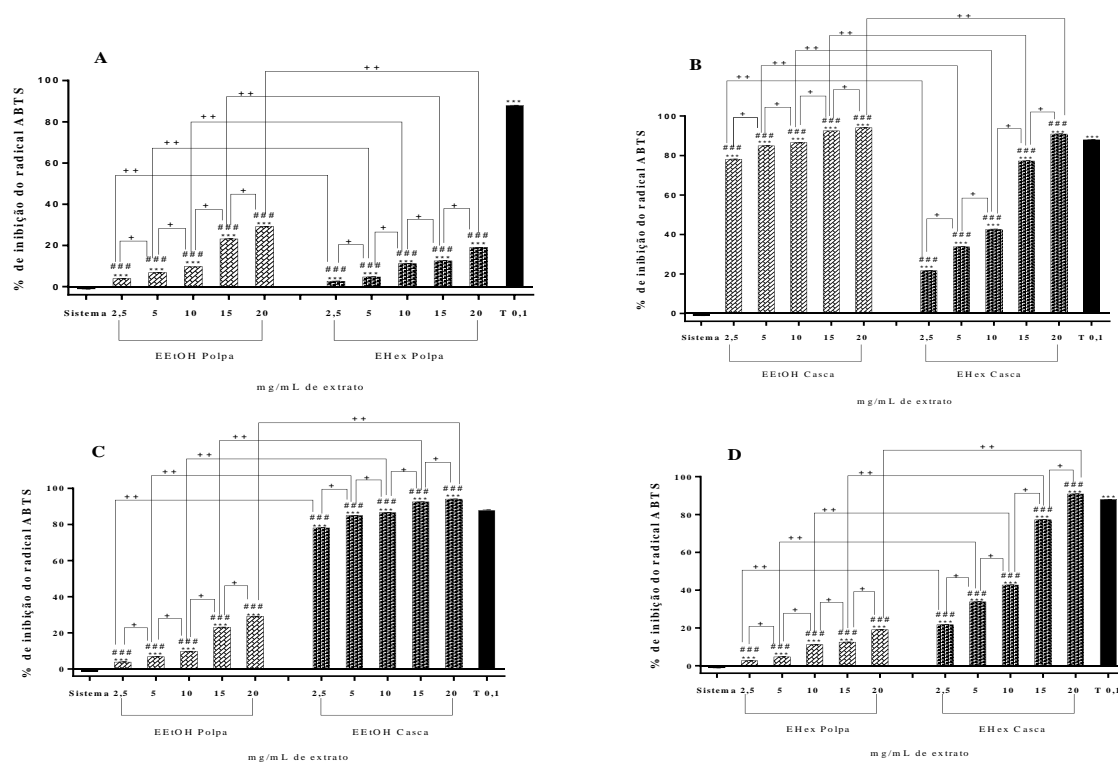


Figura 7.

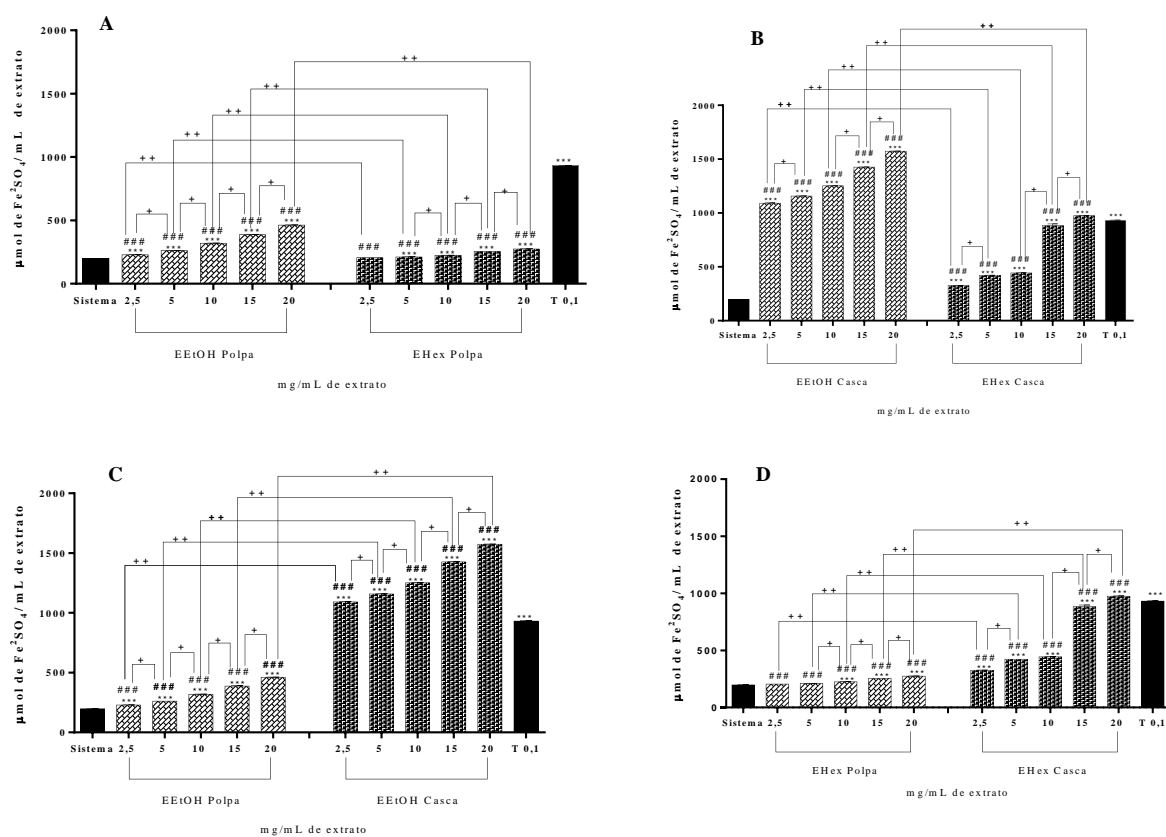
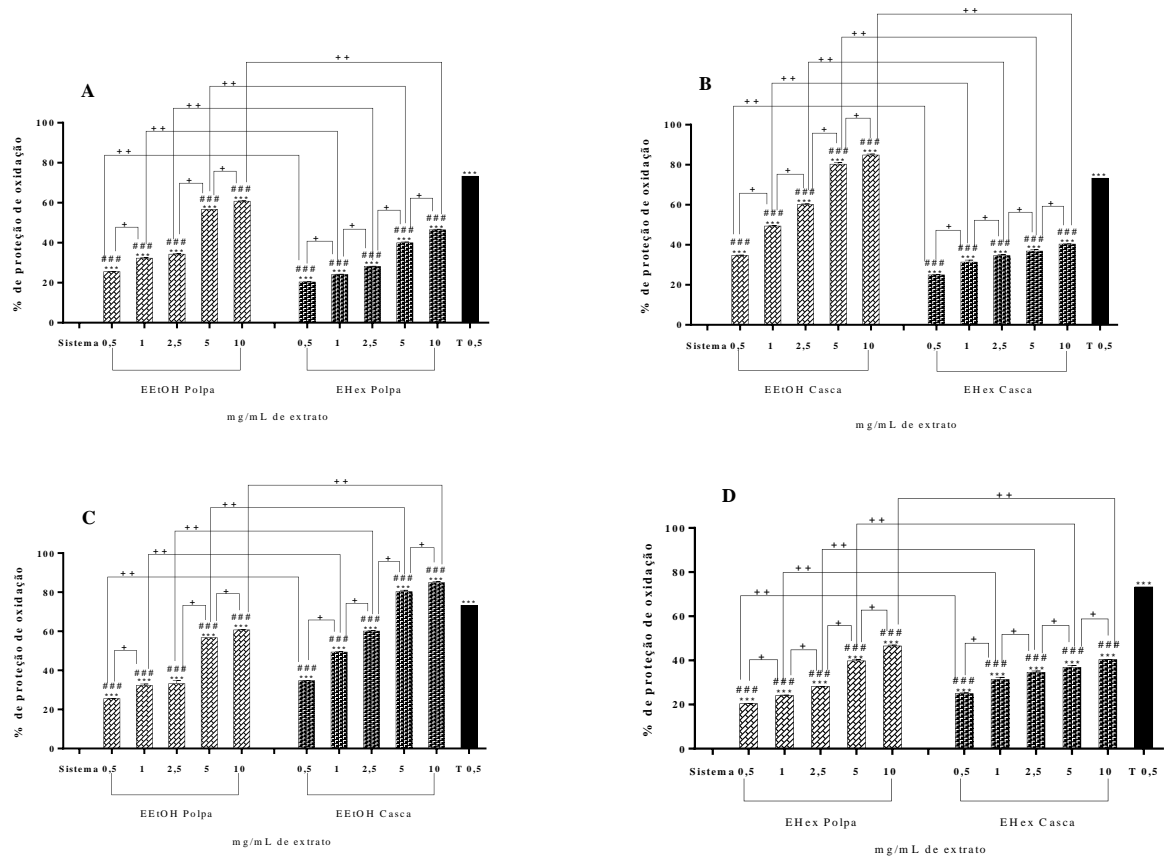


Figura 8.



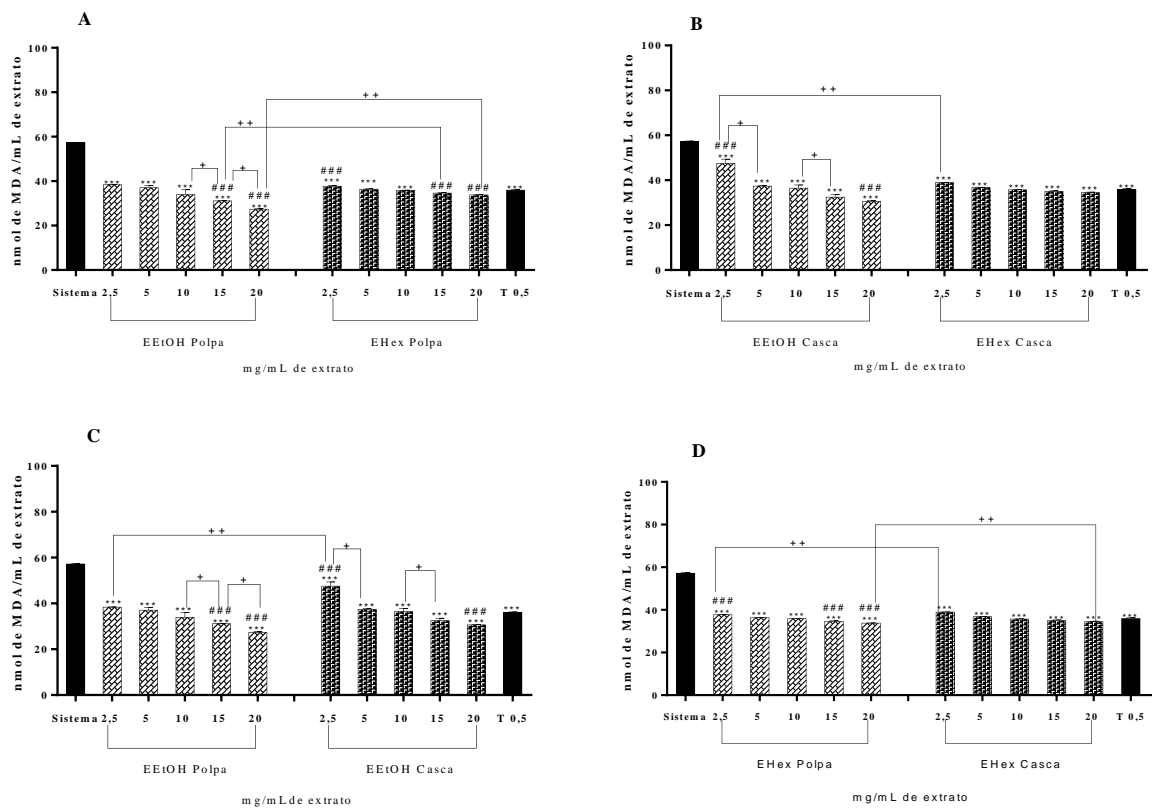


Figura 10.

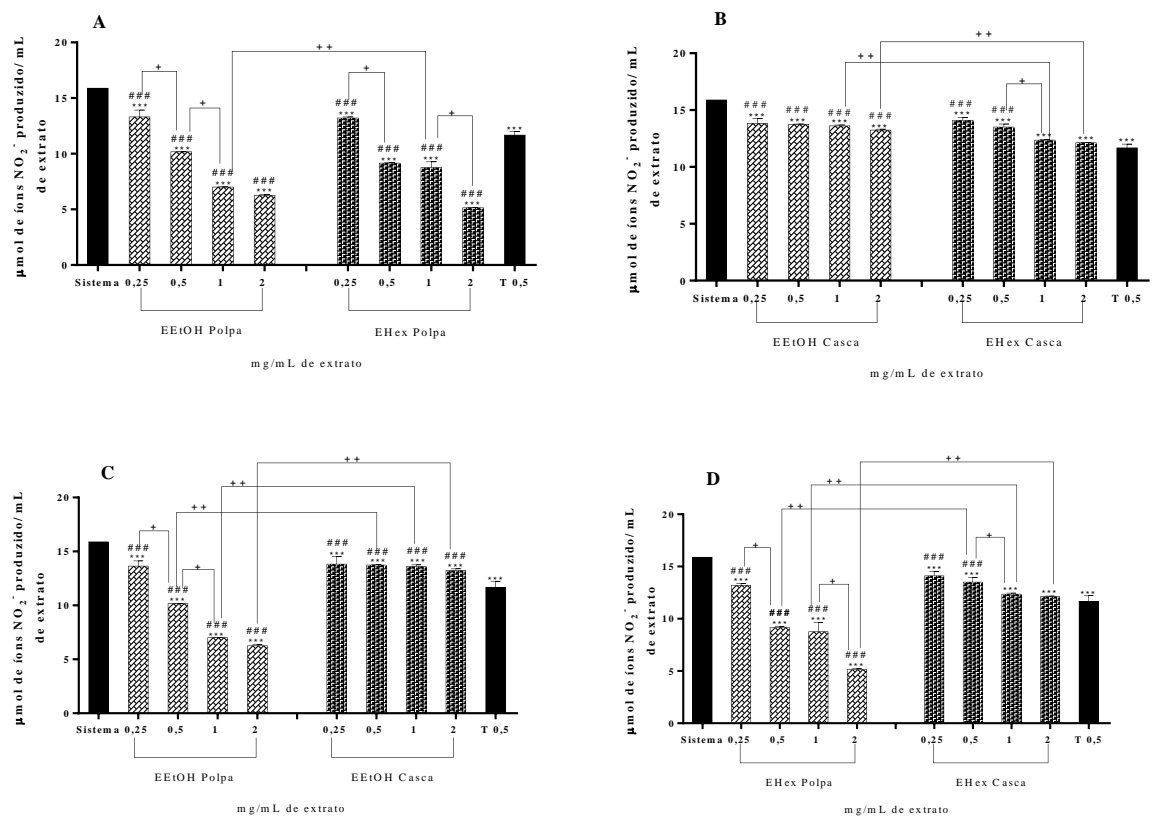


Figura 11.

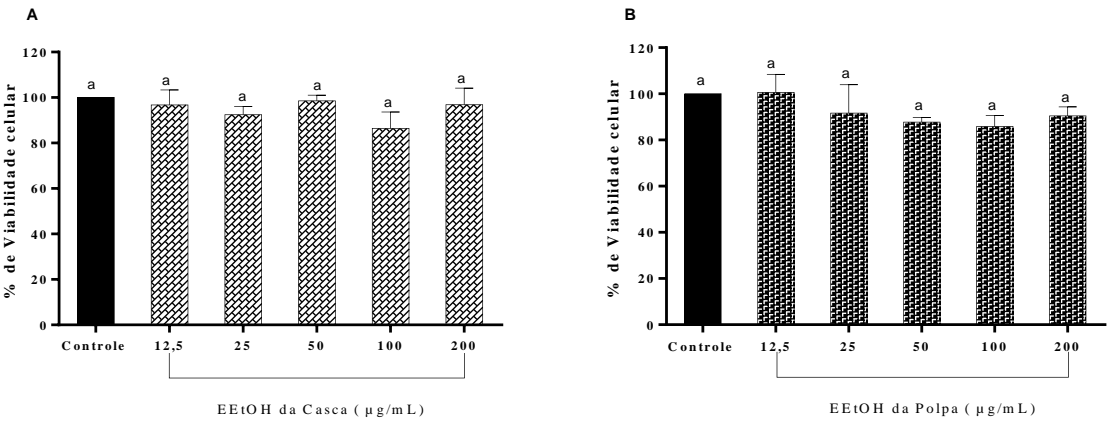


Figura 12.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

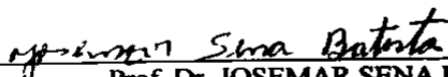


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de mangaba (*Hancornia Speciosa* G.) e Potencial antioxidante *in vitro* e efeito hepatoprotetor da polpa de pitaya (*Hylocereus polyrhizus*)**", registrada com o nº 07/2017, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Elma Regina de Andrade Wartha que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 10/04/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 20/08/2017, Término: 31/09/2017
Espécie/linhagem/raca	Rato Heterogênico Wistar
Nº de animais	56
Peso/Idade	180-200g / 2 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.



Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606